Aus dem Endokrinologischen Labor
der Farbwerke Hoechst AG. in Frankfurt a. M. - Höchst

Tierexperimentelle Untersuchungen zur Wirkung von Sulfonylharnstoffen auf Nebennierenmark und Nebennierenrinde

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Gerhard Noetzel

aus Frankfurt a. M. - Höchst

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Endokrinologischen Labor
der Farbwerke Hoechst AG. in Frankfurt a. M. - Höchst

Tierexperimentelle Untersuchungen zur Wirkung von Sulfonylharnstoffen auf Nebennierenmark und Nebennierenrinde

BIBLIOTHEK

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Gerhard Noetzel

aus Frankfurt a. M. - Höchst

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 19.11.1968

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. W.Straub

Referent: Priv.Doz. Dr. G.Vogel

Correferent: Prof. Dr. W.Schmid

Inhaltsübersicht:

A: E I N L E I T U N G

B: M A T E R I A L und M E T H O D E N

I. Blutzucker
II. Catecholaminmetabolite im Rattenurin (Vanillinmandelsäure)
III. Catecholamine
IV. Corticosteron
V. Ascorbinsäure

C: E R G E B N I S S E

1) Blutzucker
a) Kontrolltiere
b) behandelte Tiere
2) Catecholamine
A: Catecholaminmetabolite im Urin
a) Kontrolltiere
b) behandelte Tiere
B: Catecholamine in der Nebenniere
a) Kontrolltiere
b) behandelte Tiere
3) Corticosteroide
a) Kontrolltiere
b) behandelte Tiere
4) Ascorbinsäurebestimmung in der Nebenniere
a) Kontrolltiere
b) behandelte Tiere

D: D I S K U S S I O N

E: Z U S A M M E N F A S S U N G

F: T A B E L L E N und A B B I L D U N G E N

G: L I T E R A T U R N A C H W E I S

Einleitung:

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum Wirkungsspektrum der Sulfonylharnstoffe (SuH) darstellen.

Seit der Entdeckung der Sulfonylharnstoffe und ihrer Einführung in die Therapie der diabetischen Stoffwechselerkrankungen sind zahlreiche Arbeiten über die Art und Weise ihrer therapeutischen Anwendung und die möglichen Wirkungsmechanismen erschienen. Die umfangreiche Literatur sowie die grosse Zahl der Theorieen und Hypothesen, die zur Erklärung der Wirkungsweise der SuH aufgestellt wurden, verdeutlichen die Schwierigkeiten, die sich einer eindeutigen Aufklärung entgegenstellen.

Wie bei vielen anderen Medikamenten kann man auch hier bei den SuH zwischen Hauptwirkung und Nebenwirkungen unterscheiden. Der Begriff Nebenwirkung ist hier im pharmakologischen Sinne, d.h. Wirkung auf weitere Organe oder Funktionskreise, nicht etwa im toxikologischen Sinne zu verstehen. Die Hauptwirkung der SuH, nämlich Blutzuckersenkung durch die Freisetzung von Insulin aus dem Pankreas, soll im Zusammenhang mit den hier dargelegten Ergebnissen später diskutiert werden.

Die hier vorliegende Arbeit dient der Analyse der Wirkung der SuH auf die Nebennierenrinde (NNR) und das Nebennierenmark (NNM), im weiteren Sinne auf das Nebennierenhypophysen-System. Hinweise auf eine derartige Wirkung finden sich vielfach in der Literatur.

KRACHT u.RAUSCH-STROOMANN (1956) haben am Anfang einer Behandlung mit BZ 55 (Carbutamid) an der NNR Anzeichen für eine leichte Aktivierung gesehen. Nach chronischer Gabe von BZ 55 normalisierte sich aber das histologische Bild schnell wieder. KRACHT et al. (1957) beobachteten nach längerer Verabfolgung von BZ 55 lediglich eine geringgradige Nebennieren-Involution mit Rindenverschmälerung, bei sonst unauffälligem histologischen Bild.

Eine direkte Beeinflussung der Ausscheidung von

17-Ketosteroiden oder Corticoiden unter SuH-Medikation konnte von einer Reihe von Untersuchern nicht nachgewiesen werden. (PFEIFFER et al. 1956, RAUSCH-STROOMANN et al 1956, RENOLD et al. 1956, DUNCAN et al. 1956 und MORTIMORE et al. 1956). Auch signifikante Veränderungen in der Plasmakonzentration der 17-Hydroxycorticosteroide liessen sich nicht feststellen (RAUSCH-STROOMANN et al. 1957).

Am NNM kommt es nach einmaliger Gabe von D 860 (Tolbutamid) (CREUTZFELDT und FINTER 1956, BÄNDER 1958) und BZ 55 (Carbutamid) (GEPTS et al. 1956, KRACHT et al. 1957) bei Ratten, Kaninchen und Mäusen 6 und 12 Stunden nach der oralen Fütterung zu Veränderungen im histologischen Bild, mit Degranulationen und Vacuolisierung der NNM-Zellen. CREUTZFELDT u. FINTER 1956 fanden, dass diese Veränderungen mit der Blutzuckersenkung zeitlich parallel verliefen und deuteten diese Veränderungen als Sekundärerscheinungen. Demgegenüber fand BÄNDER (1958) Anzeichen dafür, dass eine einmalige Gabe von D 860 das NNM in direkter Weise im Sinne einer Funktionssteigerung beeinflussen kann. Er wies eine Vermehrung der Catecholaminausschüttung unter SuH-Behandlung an charakteristischen Aenderungen des Kaninchen-Blutdruckes nach und es gelang ihm, mit Hilfe der Yohimbin-Umkehrreaktion das wirksame Substrat als Adrenalin zu identifizieren. Allerdings konnte dieser Effekt nur nach rascher i.v. Gabe von D860 gesehen werden, da offenbar die langsame Resorption nach einer oralen Gabe einen ausreichend hohen Blutspiegel von D 860 nicht entstehen lässt.

Auch histochemische Untersuchungen desselben Autors, die bereits 20 Minuten nach Gabe von 400mg D 860 eine Degranulation der NNM-Zellen mit vergrösserten Zellkernen erkennen liessen, sprechen für eine primäre Funktionssteigerung des NNM, da das Ausmass der Blutzuckersenkung in dieser frühen Phase noch zu gering ist, um sekundäre Reaktionen am NNM auslösen zu können.

Eine Hypertrophie der gesamten Nebenniere, wie sie von BLOODWORTH et al. (1961) bei der Langzeitbehandlung mit SuH festgestellt werden konnte, ergab ebenfalls einen Hinweis für eine Nebennieren-Stimulation.

Die Befunde, die von DULIN (1956) an adrenalektomierten Ratten nach SuH-Gabe erhoben wurden, verdeutlichen den Einfluss des gegenregulatorisch wirksamen NN-Systems im SuH-Wirkungsmechanismus. Bei normalen Ratten beobachtete er einen maximalen Blutzuckerabfall auf 36mg % bei einer Dosis von 266mg/kg D 860. Die Minimal-Dosierung, die für eine deutliche Blutzuckersenkung ausreichte, lag bei 100mg/kg D 860 per os. Extrem hohe Dosen von 2g/kg D 860 p.o. führten nicht mehr zu einer Blutzuckersenkung, was auch ein Hinweis dafür ist, dass D 860 in hohen Dosen eine gegenregulatorische Wirkung, d.h. eine Stimulierung der Adrenalin-Sekretion hervorruft.

Bei adrenalektomierten Ratten sank der Blutzucker schon bei einer Minimal-Dosis von nur 9mg/kg D 860 ab. So konnte DULIN (1956) durch Gaben von niedrigen SuH-Dosen schwere Hypoglykämien, die bis zum tödlichen Schock führten, hervorrufen. Viele Autoren bestätigten diese Befunde (v.HOLT 1956, BÄNDER et al. 1956, HOUSSAY et al. 1956 und LANG u.SHERRY 1956). Durch Injektionen von Adrenalin liess sich die hypoglykämische Reaktion bei adrenalektomierten Ratten völlig aufheben, durch Injektion von Hydrocortison gelang dies nur teilweise. (DULIN et al. 1956). Das war ein Beweis dafür, dass der Ausfall des NNM mit dem Fehlen der adrenergischen Gegenregulation die Hauptursache für die nach Adrenalektomie und SuH-Gabe eintretende schwere Hypoglykämie ist. Indirekt kann man dies auch aus den Befunden an hypophysektomierten Ratten mit hochgradiger Rinden-Atrophie, die nicht stärker auf SuH-Gaben reagieren als intakte Tiere, schliessen. Da jedoch die totale Adrenalektomie zu einer zehnfachen Steigerung der Blutzuckersenkung nach SuH-Gabe, gegenüber einer drei- bis sechsfachen nach selektiver Markausschaltung führt (DULIN et al. 1956), muss man auch eine gewisse gegenregulatorische Nebennierenrinden-Stimulierung nach SuH-Gabe annehmen.

Während bei adrenalektomierten Ratten das Ausmass der Hypoglykämie sowohl nach SuH-Gaben als auch nach Insulinzufuhr zunimmt, treten bei Entfernung der Hypophyse andere Verhältnisse auf. Die SuH bewirken nur eine normale Blut-

zuckersenkung, während die Insulin-Empfindlichkeit deutlich erhöht ist. (BANDER et al. 1956, HOUSSAY et al 1956, COX et al. 1956, CREUTZFELDT et al. 1957 und DULIN et al.1959). Eine Erklärung dafür können möglicherweise die Befunde von VALLANCE-OWEN (1960) geben. Er stellte fest, dass nur bei intakter Hypophyse antagonistisch wirkende insulinbindende Eiweisskörper zu finden sind. Bei hypophysektomierten Tieren sind diese Eiweissfaktoren nicht mehr zu bestimmen, bei Ausfall der Nebennierenrinde sind sie wirkungslos, denn Adrenalektomie verhindert diese antagonistische Wirkung. Es könnte demnach zu einem Wegfall der Insulin-Bindungsfähigkeit an diese spezifischen Proteine kommen. Die Folge davon wäre eine vorübergehende Zunahme der Insulin-Aktivität.

Nach DULIN u. MILLER (1959) lässt sich die relative SuH-Resistenz der hypophysektomierten Ratten durch die Tatsache erklären, dass 4 Wochen nach Hypophysektomie der Pankreas-insulingehalt auf die Hälfte reduziert ist. Bei frisch hypophysektomierten Ratten liess sich eine Verminderung der SuH-Wirkung auf die Blutzuckersenkung nicht feststellen.

Wie aus den hier dargestellten Untersuchungsergebnissen hervorgeht haben sich Hinweise dafür ergeben, dass neben der Hauptwirkung der SuH Nebenwirkungen besonders am Nebennieren-Hypophysensystem bestehen.

Die oben zitierten Befunde konnten bis heute in diesen Fragen keine Entscheidung herbeiführen. Die teilweise direkt widersprechenden experimentellen Resultate und die Beobachtungen in der Klinik bei der Anwendung der oralen Antidiabetika mögen u.a. durch die Verschiedenheit der gegebenen Voraussetzungen bedingt sein. Sie lassen sich erklären durch die unterschiedliche Reaktion der verschiedenen Spezies, bei derselben Spezies könnten sie auf unterschiedliche Untersuchungsmethoden und Behandlungsdauer zurückzuführen sein. Nicht zuletzt spielt die Frage der Dosierungsunterschiede eine bedeutende Rolle, wie allein die paradoxen Wirkungseffekte von niedrigen und hohen SuH-Dosen erkennen lassen. Erstere erzeugen eine hypoglykämische Reaktion, während eine hohe Dosierung zu einer Umkehr der Reaktion, zu einer Hyperglykämie führen kann. (BANDER 1959). Auch die

Applikationsweise ist wegen den unterschiedlichen Resorptionsbedingungen von Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde diesen Fragen besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Die Dosierung, die Applikationsweise und das Tiermaterial wurden einheitlich gehandhabt. Mit Absicht wurde eine einmalige Gabe hoher Dosen angewendet. Damit sollten einerseits die pharmakologischen Effekte eindeutig erfasst werden, andererseits sollte vermieden werden, dass Gegenregulationen, wie sie nach Langzeitbehandlung auftreten, die Effekte verwischen. ROOT (1957 a) stellte fest, dass BZ 55-Dosen von 50-150mg/kg p.o. bei Ratten eine Zunahme der blutzuckersenkenden Wirkung brachten. Höchstdosen von 1000mg/kg waren wesentlich weniger wirksam. Für D 860 besteht eine gute Dosiswirkungsbeziehung wie bei BZ 55 nur in einem bestimmten Dosisbereich, der bei Ratten zwischen 100 und 250mg/kg p.o. liegt (DULIN et al. 1956).

In dieser Arbeit wurde eine für alle drei verwendeten Präparate einheitliche Dosierung von 200mg/kg gebraucht. Als Versuchstiere wurden männliche Ratten mit einem Gewicht von 100 bis 150g verwendet. Auf die Feststellung zeitlicher Zusammenhänge zwischen Hypoglykämie und Veränderungen im Hormongehalt des NN-Systems wurde besonderer Wert gelegt. Durch die Aufnahme der Zeitwirkungskurven sollten Hinweise dafür gewonnen werden, ob die einzelnen Wirkungen voneinander abhängig sind, oder ob ein übergeordneter Angriffspunkt vermutet werden muss.

Neben Blutzuckerbestimmungen wurden Untersuchungen über das Verhalten der Catecholaminmetabolite im Urin und über den Gehalt der Nebennieren an Catecholaminen, Corticosteron und Ascorbinsäure unter SuH-Gabe durchgeführt.

Material und Methoden:

Zu den Versuchen wurden hauptsächlich junge männliche Ratten des SPRAGUE-DAWLEY-Stammes verwendet, mit einem durchschnittlichen Gewicht von 100 bis 150 gr. Zum Teil fanden auch WISTAR- und BUCHMEIER-Ratten Verwendung. Da die experimentellen Ergebnisse mit den bei SPRAGUE-DAWLEY-Ratten erhobenen Befunden übereinstimmten, wurden sie in der statistischen Auswertung zusammengefasst. Die Tiere wurden bei einer Standard-Diät und Trinkwasser ad lib. gehalten. Die Dosierung bei allen Untersuchungen wurde einheitlich gehandhabt. Es wurden jeweils 200 /mg/kg Körpergewicht der Präparate Tolbutamid, Chlorpropamid oder Carbutamid gegeben, die als Na-Salze (2,5 ml/100g Ratte einer 0,8%igen Lösung) p.o. verabreicht wurden. Der ph-wert der Lösungen wurde auf 7,6 bis 7,8 eingestellt. Die jeweiligen Kontrolltiere erhielten 2,5 ml/100g Körpergewicht physiologische Kochsalzlösung.

Für die Bestimmung der Catecholamine im Nebennierenmark und der Corticosteroide und der Ascorbinsäure in der Nebennierenrinde wurden die Ratten 1, 2, 6, 15 und 24 Stunden nach oraler Fütterung mit den Präparaten bzw. mit 0,9%iger NaCl-Lösung in Nembutal-Narkose (0,25 ml pro 100gr. Körpergewicht intraperitoneal) adrenalektomiert.

Die Bestimmung des Blutzuckers der Catecholaminmetabolite, des Corticosterons und der Ascorbinsäure wurde mit folgenden Methoden durchgeführt:

I.) Blutzucker:
Die Bestimmung der Blutzuckerwerte wurde nach einer von P.HAJDU und A.HÄUSSLER (1962) modifizierten HAGEDORN-JENSEN-Methode im Autoanalyzer (SKEGGS 1957) durchgeführt. Das Blut wurde den Ratten in Nembutal-Narkose aus der Zungenvene entnommen.

II.) Vanillinmandelsäure:
Für jeden Versuch wurden die Ratten in 8 Gruppen zu 3 Tieren eingeteilt, wovon je 2 Gruppen für Kontrolle, Tolbutamid, Chlorpropamid und Carbutamid bestimmt waren.

Nach der Fütterung mit den Präparaten wurden die Tiere für 6 Stunden ohne Wasser- und Nahrungszufuhr in Diuresekäfigen gehalten. Die Urinmengen wurden gesammelt und nach der Methode von A.J.WOIWOD und R.KNIGHT (1961) untersucht. Diese Methode hat sich auf Grund ihrer einfachen Anwendung und der gut reproduzierbaren Ergebnisse für Reihenversuche empfohlen. Sie beruht auf dem Prinzip der Azo-Farbstoffbildung. Vanillinmandelsäure wird dabei mit diazotiertem p-Nitroanilin gekoppelt. Dieser Komplex kann durch Chloroformextraktion aus der Kaliumkarbonat-Lösung von störenden gefärbten Substanzen getrennt und nach Rückextraktion mit n/10 NaOH als rotgefärbte Lösung im Photometer bestimmt werden.

Lösungen:

1.) p-Nitroanilin-Reagenz:
   a) Stammlösung: 0,5 g p-Nitroanilin in 3 ml konz. Salzsäure lösen, mit aqua dest. auf 500 ml auffüllen und filtrieren.
   b) Frisch bereitetes Reagenz: 50 ml Stammlösung und 50 ml 0,05%ige Natriumnitritlösung mischen, 2 Minuten stehen lassen und dann 50 ml 0,025%ige Ammoniumsulfamatlösung zufügen. (Dieses Reagenz ist nur für ca. 2 Stunden im Eis haltbar).

2.) 10%ige wässrige Kaliumkarbonat-Lösung

3.) Standardlösung: 10 mg DL-3-methoxy-4-hydroxymandelsäure in 100 ml aqua dest. lösen (im Eisschrank aufbewahren). Von dieser Standardlösung werden folgende Verdünnungen hergestellt: 10, 20, 50, 100, 200 gamma Vanillinmandelsäure in 10 ml aqua dest., davon je 2 ml durch den Analysengang laufen lassen.

Aufarbeitung:

2 ml Urin (wenn verunreinigt, vorher filtrieren) werden mit 3 ml aqua dest., 0,5 ml konzentr. Salzsäure und Natriumchlorid im Überschuss (sodass Rest ungelöst bleibt) im 250 ml-Scheidetrichter 5mal mit je 40 ml Aether ausgeschüttelt. Die vereinigten Aetherauszüge (200 ml) sind nun mit 25 ml aqua dest. und tropfenweise 1n NaOH

(bis pH 10-11), dann mit 15 ml aqua dest., dann mit 10 ml aqua dest. auszuschütteln. Es ist darauf zu achten, dass die Extraktion in alkalischer Reaktion (pH 8-9) durchgeführt wird. Die vereinigten wässrigen Auszüge (50 ml) werden mit n/10 Salzsäure (tropfenweise) neutralisiert. (elektrisches pH-Meter). Nun werden 5 ml frisch bereitetes p-Nitroanilin-Reagenz dazu gegeben, das Ganze nach dem Umschütteln 2 Minuten stehen gelassen. Dann wird mit 5 ml 10%iger Kaliumkarbonatlösung gemischt und 5 Minuten stehen gelassen. 60 ml der gefärbten wässrigen Lösung sind nacheinander mit 15, 10 und 5 ml Chloroform auszuschütteln. Die vereinigten Chloroform-Auszüge (30 ml) werden sofort mit 10, 5, 3 und 2 ml n/10 NaOH hintereinander ausgeschüttelt, im Zentrifugenglas abzentrifugiert und abgesaugt. Die vereinigten NaOH-Auszüge (etwa 20 ml) werden genau auf 20 ml mit aqua dest. aufgefüllt. Die gefärbten Lösungen können nun in 2 ccm-Küvetten im Photometer (Elko III) mit Filter S 53 gegen einen H_2O-Wert abgelesen werden. Vom Zusatz des p-Nitroanilin-Reagenzes bis zur NaOH-Extraktion muss rasch und unter Ausschluss des Sonnenlichts gearbeitet werden.

III.) Catecholamine:

Die für die Bestimmung der Catecholamine im Nebennierenmark benutzte Methode wurde von D.A.SHORE und J.G.OLIN (1958) angegeben. Sie beruht auf dem fluorimetrischen Prinzip. Die Catecholamine werden dabei aus dem homogenisierten Gewebe mit Butanol extrahiert und aus diesem durch Erniedrigung ihrer Löslichkeit mit n-heptan in die wässrige Phase zurückgedrängt. Mit Hilfe der Oxydationsmethode von LUND (1949) werden die Catecholamine nach der Extraktion aus dem Gewebe in stark fluoreszierende Trihydroxyindolkörper umgewandelt und im Filterfluorimeter gegen einen bekannten Standard abgelesen. Die Lösungen werden mit einem Primärfilter (FARRAND-Interferrenzfilter No.290638) bei 405 mμ (Anregungsmaximum 400 mμ) aktiviert und die resultierende Fluoreszenz mit einem FARRAND-Interferrenzfilter (als Sekundärfilter) bei 528 mμ (Emmissionsmaximum 520 mμ) im FARRAND-Filterfluorimeter abgelesen.

Lösungen:

1.) n-Butanol, n-Heptan
2.) Jod-Reagenz: 0,1n
    1,27 g Jod (analysenrein) wird in 100 ml absol. Alkohol gelöst.
3.) Natriumthiosulfat: 0,05n
    1,24 g reines $Na_2S_2O_3 . 5H_2O$ in 100 ml aqua dest.lösen.
4.) Acetat-Puffer: 2m, pH 5,0
    2 Vol. 2m Na-acetat mit 1 Vol. 2m Essigsäure mischen.
5.) Alkalische Ascorbinatlösung:
    1 Vol. einer wässrigen Ascorbinatlösung (10 mg/ml) mit 2 Vol. 5n NaOH mischen (diese Lösung ist vor dem Gebrauch frisch anzusetzen).
6.) Standardlösungen:
    1, 2 und 5 mg Arterenol in 100 ml 0,01n HCl lösen (im Eisschrank für einige Tage haltbar).
    Je 0,5 ml der Standardlösungen wie Nebennierenhomogenat durch den Analysengang laufen lassen.

Aufarbeitungen:

Abweichend von den in der Originalmethode angegebenen Reagenzmengen, die auf grössere Gewebeteile abgestimmt sind, waren für die relativ kleinen Mengen der Rattennebennieren einige Veränderungen notwendig. Aus diesem Grunde seien einige Schritte der Aufarbeitung kurz angeführt.

Die beiden der Ratte entnommenen Nebennieren werden nach Abpräparieren des Bindegewebes zusammen gewogen und in 1 ml 0,01n HCl mit einem motorgetriebenen Glashomogenisator (5 ml-POTTER-Glashomogenisatorgefäss, eisgekühlt) homogenisiert. 0,5 ml des Homogenates werden in einem 10 ml-Spitzglas (mit Glasstopfen) zusammen mit etwas NaCl (im Überschuss) und 5 ml Butanol auf einer elektrischen Schüttelapparatur 1 Stunde lang geschüttelt, dann zentrifugiert. 4,0 ml des Butanol-Extraktes werden in ein 20 ml-Spitzglas (mit Glasstopfen) abpipettiert und zusammen mit 5,0 ml 0,01n HCL und 7,0 ml n-Heptan für 5 Minuten geschüttelt. Das Butanol-Heptan-Gemisch wird nun verworfen.

3,0 ml der wässrigen Phase sind nun mit 1,0 ml Natriumacetatpuffer (pH 5,0) und 0,1 ml Jod-Reagenz (0,1n) gut zu mischen und nach 6 Minuten mit 0,2 ml Thiosulfatlösung (0,05n) und 1,0 ml der alkalischen Ascorbatlösung zu versetzen. Nach 45 Minuten wird dann die Fluoreszenz, wie oben beschrieben, im FARRAND-Fluorimeter abgelesen.

IV.) Corticosteron:

Für die Bestimmung der Corticosteroide wurde eine nach DORFMAN modifizierte Methode benutzt. (DORFMAN, Methods in Hormone Research S 253). Es handelt sich dabei im Prinzip um eine fluorimetrische Methode. Das NN-Homogenat wird zunächst mit Petroläther gereinigt und dann mit Methylenchlorid extrahiert. Nachdem störende fluoreszierende Stoffe durch Ausschütteln mit NaOH aus dem Extrakt entfernt sind, wird durch Zugabe des Schwefelsäurereagenzes die Fluoreszenz hervorgerufen.

Die in 4 Gruppen aufgeteilten Ratten wurden, wie oben angegeben, mit einer 0,8%igen Na-Salz-Lösung der Präparate Tolbutamid, Chlorpropamid oder Carbutamid (200 mg/kg) p.o. gefüttert und nach 1, 2, 6, 15 und 24 Std. in Nembutal-Narkose (0,25 ml pro 100 gr. Körpergewicht) adrenalektomiert, die Nebennieren nach Abpräparieren des Bindegewebes sofort gewogen. Die Corticosteroidbestimmung erfolgte in der linken Nebenniere, während gleichzeitig die rechte Nebenniere desselben Tieres auf ihren Ascorbinsäuregehalt untersucht wurde.

Reagenzien:

1.) 13%iges und 33%igesAethanol
2.) Petroläther
3.) Methylenchlorid
4.) Fluoreszenzreagens:
    3 Vol. 96%iges Aethanol werden mit 7 Vol. konz. Schwefelsäure vermischt.
5.) Standard:
    10 mg Corticosteron werden in 100 ml 13%igem Aethanol gelöst (für etwa 8 Tage im Kühlschrank haltbar).

Für die Eichkurve stellt man Lösungen von 5, 10 und 20 gamma/100 ml her, wovon je 2 Proben, zusammen mit je 2 Wasser- und 2 Sandleerwerten durch den Analysengang laufen.

Aufarbeitung:
Nachdem die Nebenniere in einem 10 ml-Spitzglas in 2 ml 33%igem Aethanol und etwas Seesand mit dem Glasstab homogenisiert ist, werden 3 ml aqua dest. zugesetzt, das Ganze gut umgeschüttelt und dann abzentrifugiert. Von dem Überstand werden 2 mal je 1 ml in ein 10 ml-Spitzglas abpipettiert. (Von den Eichkonzentrationen werden auch jeweils 2 Proben bestimmt). 1 ml 13%iges Aethanol und 5 ml Petroläther werden dazugegeben und für 1 Minute geschüttelt. Der Petroläther ist danach abzusaugen. 1,5 ml der wässrigen Phase werden nun mit 4 ml Methylenchlorid 1 Minute geschüttelt, dann abzentrifugiert und verworfen. Der Methylenchloridextrakt wird kurz mit eiskalter n/10 NaOH ausgeschüttet und diese sofort wieder abgesaugt. 3 ml des Methylenchloridextraktes sind nun 1 Minute lang mit 3 ml Fluoreszenzreagenz zu schütteln, das Methylenchlorid ist zu verwerfen. Nach 1 Stunde kann die Fluoreszenz im FARRAND-Filterfluorimeter mit folgender Filterkombination abgelesen werden.
Primärfilter: Corning 5-58 und 3-73
Sekundärfilter: Wratten Gelatine No. 74 und 16.

V.) Ascorbinsäurebestimmung:

Für den Nachweis der Ascorbinsäurekonzentration in der Nebenniere wurde die Dichlorphenolindophenol-Methode (USP XVI p.1072) benutzt. Wie oben schon angegeben, wurde dazu die rechte Nebenniere verwendet, während gleichzeitig die linke Nebenniere desselben Tieres für die Corticosteroidbestimmung entnommen wurde.

Reagenzien:

1.) Metaphosphorsäurelösung:
25 gr. reine Metaphosphorsäure in Stangen werden in 1000 ml aqua dest. gelöst (1:40). Die Lösung ist im Eisschrank 1 Woche haltbar.

2.) Dichlorphenolindophenol-Standardlösung:
2,6-Dichlorphenolindophenol-Natrium (MERCK p.a.) wird im Exsikkator aufbewahrt. 42 mg Natriumbikarbonat werden in

50 ml aqua dest. gelöst und dieser Lösung unter kräftigem Schütteln 50 mg Dichlorphenolindophenol zugegeben. Wenn sich der Farbstoff aufgelöst hat, wird mit aqua dest. auf 200 ml aufgefüllt und die Lösung in eine dunkle Glasstopfenflasche filtriert. (Im Eisschrank aufbewahren.)

3.) Indophenol-acetat-Lösung:
120 ml der Dichlorphenolindophenol-Standardlösung mit aqua dest. auf 250ml auffüllen. Eine Lösung von 13,66 gr. wasserfreiem Natriumacetat wird zugesetzt, sodass ein Endvolumen von 500 ml entsteht. Mit 1,0 n Essigsäure wird auf pH 7,0 eingestellt (elektr. pH-Meter).
Die Lösung wird im Eisschrank aufbewahrt und mindestens alle 2 Wochen neu angesetzt.

4.) Standardlösung:
Ascorbinsäure wird in den Konzentrationen 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 15 pro ml in 2,5% Metaphosphorsäure gelöst.
2 ml davon werden abpipettiert und mit 2 ml Indophenolacetatlösung gemischt. Als Kontrolle dient eine Mischung von gleichen Teilen Indophenolacetatlösung und Metaphosphorsäurelösung. Im Photometer (Elko III Filter S53E) wird die Ascorbinsäureprobe auf die Extinktion 0 eingestellt und die Extinktion der Kontrollösung dagegen gemessen. Damit erreicht man, dass die Eichkurve auch bei dieser Entfärbungsreaktion durch Null geht.

Aufarbeitung:

Nach Abpräparieren des Bindegewebes und Wiegen wird die Nebenniere in 4 ml Metaphosphorsäurelösung mit etwas Seesand homogenisiert. Die Lösung ist gut umzuschütteln und dann mindestens 20 Minuten lang stehen zu lassen. Nach dem Filtrieren werden 2 ml abpipettiert, mit 2 ml Indophenolacetatlösung vermischt und in der oben beschriebenen Weise im Photometer gegen den Kontrollwert gemessen.

Ergebnisse:

1. Blutzucker:

Die Bestimmung des Blutzuckers ergab bei den unbehandelten Kontrolltieren durchschnittliche Werte um 105mg % (min. 99,4mg %, max. 109,2mg %). Bei den behandelten Tieren war eine deutliche Senkung des Blutzuckerspiegels bereits in der ersten Stunde zu erkennen. Der in Abb.1 eingetragene Blutzuckerwert stellt das Mittel des an 2o Tieren festgestellten Blutzuckerspiegels dar.

a) Kontrolltiere:

Die Zeitwirkungskurve zeigt bei den unbehandelten Kontrolltieren einen charakteristischen Verlauf der Blutzuckerspiegel mit deutlichen tageszeitlichen Schwankungen. Die Sondierung wurde um 9 Uhr vorgenommen. Eine Stunde nach der Sondierung liegt der Wert bei 101,8mg %, dann erfolgt ein Anstieg auf 109,2mg % in der zweiten Stunde. Ueber den 6 Stundenwert (105,7mg %) fällt die Kurve auf ihren niedrigsten Punkt (15 Stundenwert mit 99,4mg %) ab, um dann wieder gegen den 24 Stundenwert (108,8mg %) anzusteigen.

b) behandelte Tiere:

Auch bei den behandelten Tieren ist die Zeitwirkungskurve von den schon oben beschriebenen charakteristischen tageszeitlichen Schwankungen des Blutzuckerspiegels überlagert. Der hypoglykämische Effekt war bei den 3 verwendeten Präparaten bereits in der ersten Stunde deutlich ausgeprägt. Mit einer Erniedrigung auf 62,5% des entsprechenden Kontrollwertes (als 100% gesetzt) hatte Chlorpropamid die stärkste Wirkung (s.Abb.7) gegenüber Tolbutamid mit 69,6% (s.Abb.6) und Carbutamid mit 76,2% (s.Abb.8). Die Kurvendarstellung der einzelnen Stundenwerte in prozentualer Abhängigkeit von den jeweiligen Kontrollwerten zeigt, dass die Blutzuckererniedrigungen, von kleinen Schwankungen abgesehen, in den ersten 6 Stunden auf einem gleichhohen Niveau bleiben. Danach lässt bei allen drei Präparaten die blutzuckersenkende Wirkung wieder nach, wie die gegenüber den 6 Stundenwerten angestiegenen Blutzuckerspiegel 15 Stunden nach Versuchsbeginn zeigen. Während sich bei den mit Carbutamid behandelten Tieren nach

nach 24 Stunden der Blutzuckerspiegel wieder normalisiert hat, kann man bei den beiden anderen Präparaten nach der relativ hohen Dosis noch einen verlängerten blutzuckersenkenden Effekt, der auch in der statistischen Berechnung signifikant ist (s.Tab.1) , feststellen. So ist der Blutzuckerspiegel 24 Stunden nach Chlorpropamid- und Tolbutamid-Gaben noch auf 86,9% (P 0,001) bezw. 89,7% (P < 0,01) gegenüber der Kontrolle erniedrigt. Insgesamt gesehen hat also Chlorpropamid sowohl den stärksten als auch den am längsten anhaltenden blutzuckersenkenden Effekt. Carbutamid war mit einer rund 25%igen Erniedrigung des Blutzuckerspiegels und normalisierten 24 Stundenwerten weniger wirksam. Tolbutamid lag in seiner blutzuckersenkenden Wirkung etwa zwischen denen der beiden anderen Präparaten (s.Abb.1). Diese Befunde stehen in guter Uebereinstimmung zu früheren Untersuchungen. ROOT et al. (1959) fanden, dass die blutzuckersenkende Wirkung von Chlorpropamid bei Ratten und Hunden etwa doppelt so gross ist wie die einer entsprechenden Dosis BZ 55 (Carbutamid). SCHNEIDER et al. (1959) untersuchten vergleichend die blutzuckersenkende Wirkung von D 860 (Tolbutamid) und CHLORpropamid an Ratten und Hunden und stellten fest, dass das Ausmass der maximalen Blutzuckersenkung bei gleicher Dosierung in etwa gleich hoch war, Chlorpropamid jedoch eine länger anhaltende Blutzuckersenkung hervorrief.

2. Catecholamine:

A.: Catecholaminmetabolite im Urin:

a) Kontrolltiere:
Die Bestimmung der Catecholaminmetabolite im 6 Stunden-Urin ergab bei einer Gruppe von 77 unbehandelten Kontrolltieren eine durchschnittliche Konzentration von 12,16 gamma/ml. Bei einem Durchschnittsharnvolumen von 6,3 ml betrug die Gesamtausscheidung 75,69 gamma (s.Tab.2).

b) behandelte Tiere:
Die mit den Präparaten Tolbutamid, Chlorpropamid und Carbutamid behandelten Tiere reagierten mit einer erhöhten Ausscheidung der Catecholamine bzw. deren Stoffwechselprodukte im 6 Stunden-Urin (s.Abb.2a und 2b). Signifikant waren dabei die

Veränderungen nach Tolbutamid- und Chlorpropamid-Behandlung. Die statistische Berechnung ergab in beiden Fällen ein $P < 0,001$. Dies gilt sowohl für die in gamma/ml angegebenen Werte (Konzentration) als auch für die Gesamtmenge der im 6 Stunden-Urin ausgeschiedenen Catecholaminmetabolite. Carbutamid war diesbezüglich weniger wirksam, wie man aus den statistisch ermittelten Werten für Konzentration und Gesamtmenge ($P < 0,05$ bzw. $P > 0,05$) ersehen kann.

Bei den mit CHLORpropamid behandelten Ratten wurde die stärkste Zunahme in der Ausscheidung der Catecholaminstoffwechselprodukte beobachtet. Mit einer Konzentration von 17,87 gamma/ml Urin lagen die Werte durchschnittlich um 45,5% über denjenigen der Kontrolle. Im Vergleich der Gesamtausscheidungen bei unbehandelten und behandelten Tieren ergab sich sogar eine Zunahme um rund 128%. Die Absolutwerte lagen bei 75,69 gamma (Kontrolle) und 172,95 gamma (Chlorpropamid). Bei Tolbutamid waren diese Veränderungen nicht so stark ausgeprägt. Mit einer Erhöhung von 12,16 gamma/ml auf 16,09 gamma/ml lagen die Konzentrationen aber noch um rund 30% über denen des Kontroll-Urins. In der Gesamtausscheidung fand sich eine Vermehrung um rund 60% (von 75,69 gamma auf 121,09 gamma). Die mit Carbutamid behandelten Tiere reagierten weniger stark mit einer erhöhten Ausscheidung der Catecholaminmetabolite, wie, neben den schon oben angeführten P-Werten, eine Zunahme der Gesamtmenge um nur rund 25% verdeutlicht.

Die oben beschriebene unterschiedliche Zunahme der Konzentration einerseits und der Gesamtausscheidung andererseits, wie sie so deutlich nur nach Chlorpropamid-Gabe gefunden wurde (45,46% bzw. 128,29%), legte die Vermutung nahe, dass möglicherweise ein diuretischer Effekt entstanden war. Tatsächlich konnte eine deutliche Zunahme des Harnvolumens nach Chlorpropamid-Gabe als Nebenbefund festgestellt werden. Gegenüber einem durchschnittlichen Harnvolumen von 6,3 ml bei den Kontrolltieren, lagen die Volumina bei den mit Chlorpropamid behandelten Tieren mit 13,2 ml um rund 110% höher. Die statistische Berechnung ergab ein $P < 0,001$. Bei den beiden anderen Präparaten Tolbutamid und Carbutamid

waren die Harnmengen mit 8,6 ml bzw. 7,4 ml nur leicht, aber nicht in statistisch signifikanter Weise vermehrt.

B.: Catecholamine in der Nebenniere:

a) Kontrolltiere:
Die an je 4o Ratten bestimmten NN-Catecholaminkonzentrationen ergaben 2, 6, 15 und 24 Stunden nach Fütterung mit 0,9%iger NaCl-Lösung durchschnittliche Kontrollwerte von rund 0,770 gamma/mg NN. Der 1 Stundenwert lag demgegenüber mit 0,845 gamma/mg NN höher. 2 Stunden nach der Fütterung haben sich, wie aus Abb.3 ersichtlich, die Kontrollwerte auf ein niedrigeres Niveau eingestellt. Dieser Befund wurde als Auswirkung eines durch die orale Sondenfütterung entstandenen Stresseffektes mit einer am Catecholamingehalt sichtbaren Hormonverarmung des Nebennierenmarks nach Ablauf der ersten Stunde gedeutet.

b) behandelte Tiere:
Nur bei den mit Carbutamid behandelten Tieren liess sich bereits in der ersten Stunde eine deutliche Wirkung am Nebennierenmark feststellen. Mit einem Wert von 0,614 gamma/mg NN kam es gegenüber der vergleichbaren Kontrolle (0,845 gamma/mg NN) zu einem deutlichen, rund 27%igen Abfall der NNM-Catecholamin-Konzentration. ($P < 0,001$). Bei den mit Tolbutamid und Chlorpropamid gefütterten Tieren konnte ein solcher Effekt innerhalb der ersten Stunde nicht festgestellt werden. Konzentrationsverminderungen um 3% bzw. 9% waren bei der statistischen Berechnung nicht signifikant ($P > 0,05$ für beide Präparate). Auffallend war das Verhalten der Zeitwirkungskurven im Verlauf der ersten beiden Stunden nach Carbutamid-behandlung einerseits und Tolbutamid- und Chlorpropamid-Behandlung andererseits (s.Abb.3a). Während die NNM-Catecholamin-Konzentration nach Carbutamid-Gabe in der ersten Stunde von dem mit 0,614 gamma/mg NN überhaupt niedrigsten Wert der ganzen Kurve zu dem 2 Stundenwert (0,753 gamma/mg NN ansteigt, ist im Vergleich dazu bei den mit Tolbutamid und Chlorpropamid behandelten Tieren ein Konzentrationsabfall von der ersten zur zweiten Stunde festzustellen. Dieser Effekt wird später noch näher zu erörtern sein.

Das Maximum der Catecholaminverarmung im NNM wurde bei den mit den 3 Präparaten behandelten Tieren übereinstimmend nach 6 Stunden erreicht. Die Erniedrigung der Catecholaminkonzentrationen von der 2. zur 6. Stunde erfolgt in allen 3 Fällen in gleicher Weise (s.Abb.3a). Mit einer Erniedrigung auf 0,547 gamma/mg NN gegenüber einem Kontrollwert von 0,765 gamma/mg NN, das sind rund 30%, war der Effekt bei den Tieren nach Tolbutamid-Gabe am stärksten. Es folgen Chlorpropamid mit einer rund 25%igen und Carbutamid mit einer rund 20%igen Senkung des NNM Catecholamingehaltes (s.Abb.6, 7 u.8). 15 Stunden nach SuH-Gaben ist wieder eine Zunahme der Catecholaminkonzentration im NNM zu erkennen. Die 24 Stundenwerte haben sich bei den mit Chlorpropamid und Carbutamid behandelten Tieren den entsprechenden Kontrollwerten wieder weitgehend angeglichen. Bei Tolbutamid liegen die 24 Stundenwerte noch um rund 7% unter denen der Kontrollen. ($P < 0,05$).

Das oben beschriebene entgegengesetzte Verhalten der 1 und 2 Stundenwerte nach Tolbutamid- und Chlorpropamid-Behandlung einerseits und Carbutamid-Gabe andererseits gab Anlass zu einer gesonderten Untersuchung dieses Phänomens. Wie aus Abb.3a ersichtlich, ergaben sich nach Tolbutamid- und Chlorpropamid-Gabe abfallende Catecholaminkonzentrationen von der ersten zur zweiten Stunde. Nach Carbutamid-Behandlung steigen die Konzentrationen umgekehrt von der ersten zur zweiten Stunde an, um erst dann wieder, wie bei den beiden anderen Präparaten, auf das niedrigste Niveau nach 6 Stunden abzusinken. Die graphische Darstellung Abb.3a zeigt den zweiphasischen Kurvenverlauf.

Das Argument einer Beeinflussung der Mittelwertberechnung durch extrem niedrige 1 Stundenwerte wird durch die vergleichende Betrachtung der einzelnen Catecholaminkonzentrationen entkräftet. Insgesamt standen jeweils 36 Tiere sowohl für Kontrolle und Präparat, als auch für die Bestimmung der 1, 2, 6, 15 und 24 Stundenwerte zur Verfügung. An 14 Gruppen zu je 2 Tieren konnten nach Carbutamid-Behandlung höhere 2 Stundenwerte festgestellt werden. Bei 4 Gruppen zu je 2 Tieren lagen die 1 Stundenwerte nur unwesentlich höher bzw. in gleicher Höhe wie die 2 Stundenwerte.

Bei der Betrachtung des zweiphasischen Kurvenverlaufs musste auch an die Möglichkeit eines durch die Fütterung bedingten Stress-Effektes gedacht werden, obwohl nicht ohne weiteres einzusehen ist, warum gerade die orale Fütterung mit Carbutamid einen solchen Effekt, der bei Verwendung der beiden anderen Präparate fehlte, entstehen liess. Diese Frage gab Anlass zu einer gesonderten Untersuchung.

Zur weitgehenden Ausschaltung einer durch die orale Sondenfütterung bedingten Stress-Wirkung wurde die folgende Versuchsanordnung gewählt.

Versuch I:
Zunächst sollte das Ausmass einer durch die Behandlungsweise der Tiere (Aussortieren, orale Sondenfütterung) bedingten Wirkung auf die Catecholaminkonzentration im NNM ermittelt werden. Es wurden dazu 48 Tiere in 2 Gruppen für die Bestimmung der 1 bzw. 2 Stundenwerte und jede der beiden Gruppen noch einmal in 2 Untergruppen aufgeteilt, sodass also insgesamt 4 Gruppen zu je 12 Tieren zur Verfügung standen. Zwei der Untergruppen (1 und 2 Stundenwert) wurden nun wie üblich mit 0,9%iger NaCl-Lösung gefüttert und dann nach 1 bzw. 2 Stunden in Nembutalnarkose adrenalektomiert. Zur gleichen Zeit wurden die Tiere der beiden anderen Untergruppen, die unbehandelt blieben, getrennt in verschiedenen Käfigen gehalten und ebenfalls nach 1 bzw. 2 Stunden in Nembutalnarkose adrenalektomiert. Im Falle einer durch die Prozedur der oralen Fütterung erzeugten Stress-Wirkung mit Veränderungen im Catecholamingehalt des NNM musste bei den Tieren, die einer solchen Behandlung nicht unterworfen waren, eine nennenswerte Differenz zwischen den 1 und 2 Stundenwerten fehlen. Tatsächlich lagen die Werte bei den unbehandelten Tieren nach 1 bzw. 2 stündiger Bestimmung des NNM-Catecholamingehaltes mit 0,690 gamma/mg NN bzw. 0,681 gamma/mg NN dicht beieinander. Bei den wie üblich mit der Kontroll-Lösung gefütterten Ratten lag der 1 Stundenwert bei 0,850 gamma/mg NN und damit um rund 20% über dem 2 Stundenwert (0,670 gamma/mg NN).

Versuch II und III:
Nun war zu prüfen, ob Carbutamid einen Einfluss auf den oben

beschriebenen Effekt hatte. Zu diesem Zweck wurden vergleichende Untersuchungen an wie üblich gefütterten bzw. an in Nembutal-Narkose gefütterten Tieren durchgeführt. 96 Tiere wurden in 2 Gruppen zu je 48 Tieren aufgeteilt, wovon eine Gruppe mit der Kontroll-Lösung, die andere mit der Carbutamid-Na-Salz-Lösung gefüttert wurde. Jeweils 12 Tiere der beiden Gruppen waren während der Fütterung in tiefer Nembutal-Narkose. Nach 1 bzw. 2 Stunden wurden wieder die Nebennieren entnommen und auf ihren Catecholamingehalt untersucht. Die bei den wie üblich behandelten Kontrolltieren ermittelten 1 und 2 Stundenwerte stehen mit 0,811 gamma/mg NN bzw. 0,680 gamma/mg NN in guter Uebereinstimmung zu den bereits vorher festgestellten NN-Catecholaminkonzentrationen, wie sie in Tab.3 zusammengestellt sind. Bei denjenigen Tieren, die, um eine Stress-Wirkung auszuschliessen, in Nembutal-Narkose mit der Kontroll-Lösung gefüttert wurden, lagen die 1 und 2 Stundenwerte mit 0,603 gamma/mg NN bzw. 0,591 gamma/mg NN deutlich niedriger. Auch war der bei den nicht narkotisierten Kontrolltieren beobachtete Abfall der Catecholaminkonzentration von der ersten zur zweiten Stunde nun nicht mehr festzustellen. Die Differenz zwischen diesen beiden Werten (0,603 gamma/mg NN und 0,591 gamma/mg NN) ist unbedeutend. Die bei den wie üblich mit Carbutamid-Lösung gefütterten Tieren durchgeführte NNM-Catecholaminbestimmung bestätigte erneut das Ergebnis der vorhergehenden Untersuchung. Der 2 Stundenwert lag mit 0,742 gamma/mg NN gegenüber dem 1 Stundenwert mit 0,633 gamma/mg NN ebenfalls um rund 20% höher. (Vergl.Tab.3). Bei den in der Nembutal-Narkose mit Carbutamid-Lösung gefütterten Ratten dagegen war, in analoger Weise wie bei den narkotisierten Kontrolltieren, eine deutliche Differenz zwischen 1 und 2 Stundenwert nicht mehr festzustellen. (1 Stundenwert = 0,548 gamma/mg NN, 2 Stundenwert 0,560 gamma/mg NN). (s.Abb.3b).

Diese Untersuchungsbefunde zeigen, dass die Catecholaminkonzentrationen im NNM bei den in Nembutal-Narkose gefütterten Tieren deutlich niedriger liegen als die bei den nicht narkotisierten und wie üblich behandelten Tieren. Dies trifft sowohl für die Kontrolltiere als auch für die mit den Präparaten

behandelten Tiere zu. Offenbar übt hier der Einfluss der Narkose eine Wirkung auf das NNM im Sinne einer Hormonausschüttung aus. Auch die Tatsache, dass bei den in Narkose mit Carbutamid gefütterten Tieren eine Differenz zwischen den 1 und 2 Stundenwerten nicht mehr festzustellen war, zeigt, dass das Narkoseverfahren selbst einen starken Reiz auf das NNM mit rascher, massiver Hormonausschüttung ausübt. So lässt sich ein zusätzlicher pharmakologischer Effekt von Carbutamid im Sinne eines direkten Angriffs am NNM nicht mehr sicher nachweisen.

Der zweiphasische Verlauf der Zeitwirkungskurve der, wie oben beschrieben, nach Anwendung von Carbutamid gefunden worden war, kann so gedeutet werden, dass nach einer Sofortausschüttung von Catecholaminen eine Resynthese eintritt, der dann als Gegenreaktion auf die Blutzuckersenkung eine erneute Ausschüttung folgt.

3. Corticosteroid-Bestimmung:

a) Kontrolltiere:
Die an einer Anzahl von je 30 Ratten pro Gruppe durchgeführte Bestimmung der NNR-Corticosteroide erbrachte folgende Resultate: Eine Stunde nach Fütterung der Tiere mit 0,9%iger NaCl-Lösung wurden die in Nembutal-Narkose entnommenen Nebennieren auf ihren Corticosteroidgehalt untersucht, und ein durchschnittlicher Kontrollwert von 0,0387 gamma/mg NN ermittelt. Im weiteren Verlauf der Kontrollkurve (s.Abb.4) zeigt sich, dass auch die 2, 6 und 24 Stundenwerte in der gleichen Grössenordnung liegen (s.Tab.4). Der 15 Stundenwert weicht dagegen von diesem Niveau ab. Er liegt mit 0,0282 gamma/mg NN um rund 25% unter den übrigen Kontrollwerten, was als Tagesschwankung gedeutet werden kann.

b) behandelte Tiere:
Bei den mit den Präparaten behandelten Tieren zeigten sich nach Ablauf der ersten Stunde bereits deutliche Veränderungen bezügl. des Corticosteroidgehaltes der NNR. Alle 3 Präparate führten zu einer deutlichen Verminderung der Corticosteroid-Konzentration, wobei Carbutamid mit einer Erniedrigung auf 0,0197 gamma/mg NN, das sind rund 50% des entsprechenden Kontrollwertes, am stärksten wirksam war. Tolbutamid und

Chlorpropamid mit Werten von 0,0243 gamma/mg NN bzw. 0,0250 gamma/mg NN führten zu einer rund 35%igen Senkung, verglichen mit dem entsprechenden Kontrollwert. Die graphische Darstellung der absoluten Werte in Abb.4 zeigt, dass die Zeitwirkungskurven bei allen 3 Präparaten in gleicher Weise verlaufen. Eine Erniedrigung erfolgt über den 1 Stundenwert hinaus kontinuierlich bis zur 15.Stunde. Hier erreichen die Kurven ihren Tiefpunkt und verlaufen dann wieder ansteigend zu den 24 Stundenwerten, die in allen 3 Fällen jedoch noch deutlich gegenüber dem vergleichbaren Kontrollwert erniedrigt sind. Die NNR-Corticosteroid-Konzentrationen bei den mit Chlorpropamid und Carbutamid behandelten Tieren liegen nach 24 Stunden sogar noch unter den entsprechenden 1 Stundenwerten.

Die Betrachtung der graphischen Darstellung, in der die Veränderungen hinsichtlich der NNR-Corticosteroid-Konzentration nach SuH-Gabe in prozentualer Abhängigkeit von den entsprechenden Kontrollwerten (als 100% gesetzt) angegeben sind (Abb.6, 7 u.8), zeigt gegenüber der Kurvendarstellung in absoluten Werten ein etwas anderes Bild, da damit die Tagesschwankungen eliminiert sind. Der Tiefpunkt der NNR-Corticosteroidverminderung stellt sich hier bei allen 3 Präparaten bereits nach der 6. Stunde dar. Mit einer Erniedrigung um rund 60% waren die Wirkungen von Chlorpropamid und Carbutamid gleich stark. Die Tolbutamid-Gabe führte nach 6 Stunden zu einer 50%igen Senkung der Corticosteroid-Konzentration in der NNR. Von geringen Schwankungen abgesehen bleiben bei allen 3 Präparaten die Corticosteroid-Mengen auch noch nach 15 und 24 Stunden auf einem in etwa gleichen erniedrigten Niveau. Lediglich bei Tolbutamid ist eine leicht ansteigende Tendenz der 15 und 24 Stundenwerte zu beobachten. Insgesamt gesehen haben Chlorpropamid und Carbutamid in Bezug auf eine Senkung der NNR-Corticosteroid-Konzentration sowohl eine etwas stärkere als auch länger anhaltende Wirkung als Tolbutamid entfaltet.

4. Ascorbinsäure-Bestimmung in der Nebenniere:

a) Kontrolltiere:
Die Darstellung der Ascorbinsäure-Konzentrationen der NNR in zeitlicher Abhängigkeit und unter der Beeinflussung der

SuH-Gabe zeigt einen charakteristischen Kurvenverlauf (s.Abb.5). Kontroll- und Präparate-Werte laufen, wenn auch auf unterschiedlicher Höhe, parallel zueinander. Auf einen Wert von 384,5 mg/100g NN nach einer Stunde sinkt bei den Kontrolltieren nach 2 Stunden die Konzentration der NNR-Ascorbinsäure auf den niedrigsten Wert (349,2 mg/100g NN) ab. Nach 6 Stunden erreicht die Kurve mit 379,3 mg/100g NN annähernd wieder das Niveau des 1 Stundenwertes und hat dann nach 15 Stunden mit 450,6 mg/100g NN ihr Maximum. Der 24 Stundenwert fällt wieder auf 419,0 mg/100g NN ab. Es sind also auch bei den Ascorbinsäurewerten Tagesschwankungen zu verzeichnen.

b) behandelte Tiere:
Die Wirkung der 3 Präparate zeichnet sich schon nach einer Stunde deutlich ab. Mit einer durchschnittlichen Erniedrigung von 30 bis 35% gegenüber den entsprechenden Kontrollwerten liegen die NNR-Ascorbinsäure-Konzentrationen bei den mit den SuH behandelten Tieren signifikant ($P < 0,001$) niedriger. Nach Tolbutamid- und Chlorpropamid-Gaben haben sich nach 2 Stunden die niedrigsten Werte eingestellt, bei Carbutamid ist der 2 Stundenwert nur leicht gegenüber dem 1 Stundenwert erniedrigt. Der Tiefpunkt wird hier erst nach 6 Stunden erreicht. Die ansteigende Tendenz der 15 Stundenwerte ist bei allen 3 Präparaten gleich, ebenso wie die noch deutliche Verminderung der NN-Ascorbinsäure-Konzentration nach 24 Stunden.

Der parallele Verlauf der Zeitwirkungskurven der 3 Präparate zu den tageszeitlichen Schwankungen im NN-Ascorbinsäuregehalt der unbehandelten Kontrolltiere ist deutlich zu sehen, wenn man die Darstellung in Absolutwerten betrachtet. (s.Abb.5). Die graphische Darstellung der einzelnen Konzentrationen in prozentualer Abhängigkeit von den entsprechenden Kontrollwerten (als 100% gesetzt) (s.Abb.6, 7 u.8) ergibt folgenden Aspekt. Die bereits innerhalb der ersten Stunde nach SuH-Gabe erfolgte Verminderung des NN-Ascorbinsäuregehaltes um rund 30 bis 35% bleibt bis zur 6. Stunde konstant. Dies trifft für Chlorpropamid und Carbutamid zu. Bei den mit Tolbutamid behandelten Tieren ist nach 6 Stunden ein Anstieg der Ascorbinsäure-Konzentration in der Nebenniere zu beobachten, d.h.

die 6 Stundenwerte haben sich schon bis zu 80% den entsprechenden Kontrollwerten genähert. 15 bzw. 24 Stunden nach der Tolbutamid-Gabe sind nur noch durchschnittliche Verminderungen der NN-Ascorbinsäure-Konzentrationen um rund 10% festzustellen, während bei Chlorpropamid und Carbutamid die entsprechenden Werte noch deutlich um ca. 20% erniedrigt sind. Wie schon bei der Corticosteroid-Bestimmung festgestellt worden war, war auch hier die Wirkung des Tolbutamids bezügl. der Senkung des NN-Ascorbinsäure-Gehaltes nicht so stark ausgeprägt wie bei den beiden anderen Präparaten.

Diskussion:

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen, dass jedes der drei verwendeten Präparate, Tolbutamid, Chlorpropamid und Carbutamid in der Dosierung von 200 mg/kg Körpergewicht einen deutlichen blutzuckersenkenden Effekt bereits innerhalb der ersten Stunde hat. Im akuten Versuch, nach einmaliger Gabe, entwickelte Chlorpropamid im Vergleich zu den beiden anderen Präparaten sowohl die stärkste, als auch die am längsten anhaltende hypoglykämische Wirkung. Diese Befunde entsprechen den vielfach beschriebenen Beobachtungen, wie sie sich in vergleichenden Tierversuchen und in der klinischen Verwendung dieser Präparate ergeben haben.
Zeitlich parallel zu den Blutzuckerwerten wurden die Nebennierenrinden- und Nebennierenmarkhormone bzw. deren Metabolite bestimmt, um aus dem Verlauf der Zeitwirkungskurven Aufschlüsse über Ausmass und Art einer am Nebennieren-System auftretenden Arzneimittelwirkung zu erhalten. Durch die vorliegenden Befunde konnte eindeutig gezeigt werden, dass es nach einer einmaligen, relativ hoch dosierten Gabe von Sulfonylharnstoffen nicht nur zu einer Ausschüttung von Catecholaminen aus dem Nebennierenmark, sondern auch zu einer starken Corticosteroid- und Ascorbinsäure-Ausschüttung aus der Nebennierenrinde kommt. Damit ergab sich die Frage, ob und in welchen Fällen es sich hierbei um eine primäre Wirkung auf das Nebennieren-System handelt, oder ob die Effekte als Gegenregulation auf die Blutzuckersenkung zu deuten sind.

Abgesehen von den noch im einzelnen zu diskutierenden Befunden bei den Catecholaminen sprechen unsere Ergebnisse dafür, dass sich primäre und sekundäre Wirkung überlagern. Für den Zeitraum vom Versuchsbeginn bis zu Ermittlung der 1 Stundenwerte konnte jedoch die hier gewählte Versuchsanordnung nur zum Teil eine Antwort auf die Frage nach einem primären oder sekundären Wirkungsmechanismus am NN-System erbringen. Wie die Abb. 6, 7 und 8 zeigen, hat sich innerhalb der ersten Stunde das Blutzuckerniveau in allen drei Fällen bereits auf den niedrigsten Wert eingestellt und bleibt, von kleinen Schwankungen bei Chlorpropamid und Carbutamid abgesehen, auch in den ersten 6 Stunden erhalten.

Im Vergleich zur Blutzuckerkurve zeigt sich bei der Catecholaminbestimmung nach Tolbutamid- und Chlorpropamid-Gabe ein Nachhinken hinter den erniedrigten Blutzuckerwerten. Bei Tolbutamid stellt sich eine Wirkung auf das Nebennierenmark, wenn man die nach einer Stunde nur um 3% erniedrigten Werte betrachtet, erst nach Ablauf der zweiten Stunde ein. Auch nach Chlorpropamid-Behandlung war die 9%ige Erniedrigung nach einer Stunde noch nicht statistisch signifikant. Die Carbutamid-Einwirkung dagegen führte nach einer Stunde zu einer Senkung um 27%, die von einer relativen Steigerung im 2-Stundenwert und schliesslich wieder von einer Senkung des NNM-Catecholamingehaltes gefolgt war. Dieser Befund ist am ehesten so zu deuten, dass sich primäre Wirkung auf das NNM und Gegenregulation auf die Blutzuckersenkung überlagern.

Nach der zweiten Stunde verlaufen die Zeitwirkungskurven der drei Präparate in einer gewissen parallelen Abhängigkeit zur Blutzuckerkurve mit einem Minimum in der 6. Stunde und ansteigender Tendenz bis zum ermittelten Durchschnitts-Kontrollwert nach 24 Stunden. Ein erst nach bereits erniedrigtem Blutzuckerspiegel einsetzender Wirkungsbeginn am Nebennierenmark für sich allein gesehen, wäre gut mit der von vielen Autoren vertretenen Theorie einer durch die Hypoglykämie induzierten Nebennieren-Stimulation in Einklang zu bringen. Schon im Jahre 1924 berichteten HOUSSAY u. CANNON über eine vermehrte Adrenalin-Ausschüttung unter hypoglykämischen

Bedingungen im Tierversuch. 1952 stellten EULER u. LUFT dieselbe Reaktion auch am Menschen fest. Sie fanden eine selektive Adrenalin-Ausschüttung nach insulininduzierter Hypoglykämie, gemessen an den Urin-Catecholaminen. GOLDFIEN (1958) beschrieb diesen Effekt nach Untersuchungen am Hund. Er stellte eine relativ schnelle Adrenalin- und Noradrenalin-Ausschüttung im peripheren Plasma bei Blutzuckerwerten von 30mg % fest, konnte aber durch Glukoseinfusionen diesen Effekt wieder rückgängig machen. UNGER (1962) führt die Adrenalin-Ausschüttung im hypoglykämischen Stadium auf eine Glukagonaktivierung zurück und schreibt ihr damit eine sekundäre Rolle zu. Diese Auffassung wird durch die Untersuchungen von SARCOINE et al. (1963) unterstützt, wonach intravenöse Glukagon-Gaben eine Erhöhung des Plasmaadrenalingehaltes auslösen. Diese Befunde würden die Theorie unterstützen, die besagt, dass es sich bei der durch die Gabe von SuH hervorgerufenen Blutzuckersenkung um den einzigen Stimulus im Bereich des mit dem KH-Stoffwechsel eng verknüpften Nebennieren-Systems handelt.

Es kann nach der heute allgemein anerkannten Auffassung vom Wirkungsmechanismus der SuH als sicher angenommen werden, dass das Hauptwirkungsprinzip der oralen Antidiabetika auf einer B-Zell-Stimulation mit Insulin-Freisetzung (v.HOLT et al. 1956, KRACHT et al. 1957, PFEIFFER et al. 1957, BÄNDER et al. 1957 und GUSEK u.KRACHT 1959) und darüber hinaus auf einer Wirkungssteigerung des Plasmainsulins (Zunahme der Insulinähnlicher Aktivität) (GOLTZ u. EGDAHL 1958, PFEIFFER,PFEIFFER, DITSCHUNEIT u. CHANG-SU AHN 1959, PFEIFFER, DITSCHUNEIT u. ZIEGLER 1961) beruht.

Nun haben sich in der vorliegenden Arbeit, wie beschrieben, Anzeichen für eine SuH-Wirkung im Bereich der Nebennieren ergeben, die mit einem ausschliesslich durch die Hypoglykämie produzierten Effekt nicht ohne weiteres zu erklären sind. Es zeigte sich, dass die 1-Std.-Catecholaminwerte, in gewissem Masse auch noch die 2-Std.-Werte, bei den drei verschiedenen Präparaten in unterschiedlicher Höhe liegen und einen unterschiedlichen Verlauf zeigen, obwohl die Blutzuckerwerte im

Durchschnitt bei allen Präparaten übereinstimmend um rund 30% erniedrigt sind. Unter der Annahme einer ausschliesslich hypoglykämisch induzierten Catecholaminausschüttung wäre einem bestimmten Blutzuckerspiegel ein bestimmter Catecholaminwert zuzuordnen. Das ist hier offenbar nicht der Fall. Selbst wenn man eine Reaktion des Nebennieren-Systems durch den Stress der Fütterung in Betracht zieht, eine Beeinträchtigung also, die gerade in der Anfangsphase der SuH-Wirkung eine rein arzneimittelabhängige Hormonmengen-Bestimmung nicht zulässt, so findet sich auch darin keine Erklärung des unterschiedlichen Verhaltens der 1 Stunden-Catecholaminwerte, da der Stress der Fütterung und Behandlung bei allen Tieren der gleiche war. Zusammen mit der bei allen Präparaten ermittelten durchschnittlichen 30%igen Blutzuckersenkung liegen hier also die gleichen Voraussetzungen bei verschiedener NNM-Reaktion vor. Das weist darauf hin, dass neben einer hypoglykämisch induzierten NNM-Stimulation noch ein eigener SuH abhängiger Arzneimittel-Effekt vorhanden ist, der am stärksten bei Carbutamid, am schwächsten bei Tolbutamid ausgeprägt ist.

Die Reaktion des NNR-Systems auf eine Hypoglykämie ist bekannt. So beschrieb GOLDFIEN (1958) bei der insulin-bedingten Hypoglykämie im Hunde-Experiment einen Anstieg der 17-Hydroxycorticosteroide zeitlich gesehen schon vor einer signifikanten Adrenalinausschüttung. ZUKOSKI (1965) wies ebenfalls bei Hunden eine vermehrte 17-Hydroxycorticosteroid-Ausschüttung in der Nebennierenvene nach insulin-induzierter Hypoglykämie nach. Er fand einen deutlichen Anstieg der Nebennierenrindenhormone bereits 20 bis 30 Minuten nach Insulin-Gabe und sah einen direkten Zusammenhang zwischen einer schnell erfolgten Blutzuckersenkung und einer Nebennierenrindenstimulation. Bei gleichzeitiger Gabe von Insulin und Glukose liess sich eine vermehrte 17-Hydroxycorticosteroid-Ausschüttung nicht nachweisen. Nach SZCÜCS u. CSAPO (1964) erzeugen Hypoglykämie und Acidose gewissermassen als Stressoren eine Erhöhung in der adrenocorticalen Hormonproduktion, gemessen an einer Steigerung der 17-Hydroxycorticosteroid-Ausschüttung in Plasma und Urin. Nach unseren Befunden lassen sich jedoch an der

Nebennierenrinde, in dieser Arbeit repräsentiert durch Corticosteroide und Ascorbinsäure, in ähnlicher Weise wie am Nebennierenmark nach SuH-Gabe Veränderungen beobachten, die nicht allein mit einer rein hypoglykämisch induzierten Wirkung zu erklären sind. Der Beginn der Hormonverarmung und des Ascorbinsäureschwundes in der Nebennierenrinde liegt auch hier wieder in dem Zeitraum zwischen Versuchsbeginn und der Bestimmung nach der ersten Stunde. Es lässt sich also für diesen Zeitraum über ein mögliches Nachhinken der Nebennierenrindenreaktion hinter der Blutzuckersenkung keine sichere Aussage machen. Aber ähnlich, wie bereits oben bei der Besprechung der Catecholamin-Zeitkurve beschrieben, besteht auch hier eine auffallende Diskrepanz zwischen der Höhe der Blutzuckerspiegel einerseits und der des Corticosteroid- und Ascorbinsäuregehaltes andererseits. Deutlich kommt das bei dem Vergleich der Abb.6 und 7 mit der Abb.8 zur Anschauung. Bei einer durchschnittlichen Blutzuckersenkung um 30 bis 35% kam bei den zeitlich vergleichbaren Corticosteroid- und Ascorbinsäurewerten eine durchschnittliche Erniedrigung um 35% bzw. 30% nach Tolbutamid- und Chlorpropamid-Gabe zustande. Die Carbutamid-Gabe dagegen, die den Blutzuckerspiegel nur um rund 25% senkte, in Bezug auf den hypoglykämischen Effekt also weniger wirksam war als die beiden anderen Präparate, führte zu einer vergleichsweise stärkeren Senkung des Corticosteroidgehaltes der Nebennierenrinde auf 50% des Kontrollwertes. Eine einfache Abhängigkeit der Corticosteroid-Ausschüttung von der Höhe des Blutzuckerspiegels kann also auch hier nicht festgestellt werden. Dies wird noch deutlicher bei Betrachtung der 24 Stundenwerte. Während gerade bei Carbutamid nach einmaliger Gabe der Blutzuckerspiegel nach 24 Stunden wieder das Niveau der Kontrollwerte erreicht, sinkt der Corticosteroidspiegel in der Nebennierenrinde auf den niedrigsten Wert im Verlauf der Zeitwirkungskurve ab. Bei den beiden anderen Präparaten ist dieses Phänomen ebenfalls, jedoch weniger stark ausgeprägt. Es fehlt natürlich der Beweis, dass dieser Effekt auf einer anhaltenden Corticosteroidausschüttung bei noch bestehender SuH-Wirkung beruht. Der nach 24 Stunden noch stark erniedrigte NNR-Corticosteroid-Spiegel könnte ebenfalls durch eine nur langsam

erfolgende Resynthese und eines damit nur zögernd erfolgenden Ausgleichs des Hormondefizits bedingt sein. Andererseits kann auch eine durch SuH-Wirkung erzeugte Hypophysenstimulation und eine noch bestehende ACTH-Aktivierung diskutiert werden. C.v.HOLT et al. (1956 c) fand ebenfalls bei Untersuchungen an Ratten nach einmaliger Zufuhr von 500 mg/kg Carbutamid das histologische Bild einer progressiv transformierten Nebennierenrinde als Ausdruck einer erhöhten ACTH-Aktivität. Auch der verminderte Ascorbinsäuregehalt der Nebennierenrinde, der trotz HVL-Blockade durch Cortison bei gleichzeitiger Carbutamid-Zufuhr festgestellt wurde, deutet auf eine Stimulierung der corticotropen Partialfunktion des Hypophysenvorderlappens hin. Nach Ansicht von C.v.HOLT könnte auch eine Hemmung des ACTH-Abbaues und damit seine länger andauernde Aktivität in Betracht gezogen werden, da dieses HVL-Hormon durch das gleiche Ferment-System, welches auch Insulin abbaut, inaktiviert wird. Diese Befunde wurden in der Arbeit von C.v.HOLT als nur in Kurzzeitversuch auftretende und dann mikroskopisch nachweisbare Nebennierenrindenaktivierung diskutiert. Nach 4 monatiger Dauerzufuhr von Carbutamid fand sich wieder ein normal strukturiertes Nebennierenrindengewebe.

Sulfonylharnstoffe scheinen somit, abgesehen von der Gegenregulation auf den erniedrigten Blutzucker, auch auf anderem Wege das Nebennierenmark- und Nebennierenrinden-System zu beeinflussen.

Zusammenfassung:

Es wurden vergleichende Untersuchungen mit Tolbutamid, Chlorpropamid und Carbutamid im Hinblick auf eine mögliche Beeinflussung des Nebennierenrinden- und Nebennierenmark-Systems durchgeführt. Die Dosierung der Sulfonylharnstoffe wurde einheitlich mit 200 mg/kg Körpergewicht gehandhabt. Im Einzelnen liessen sich folgende Befunde erheben:
Die 3 verwendeten Präparate führten in der oben angegebenen Dosierung zu einer deutlichen Blutzuckersenkung bereits innerhalb der ersten Stunde. Die Blutzuckersenkung dauerte in allen drei Fällen über einen Zeitraum von 6 Stunden an und erreichte

nach 24 Std. wieder den Kontrollwert. Chlorpropamid zeigte mit einer Blutzuckererniedrigung von 62,5% (bezogen auf den als 100% gesetzten Kontrollwert) sowohl die stärkste, als auch mit einem nach 24 Std. noch auf 86,9% erniedrigten Wert die am längsten anhaltende Wirkung. Carbutamid war mit einer rund 25% maximalen Erniedrigung und normalisierten 24 Std.-Werten weniger wirksam. Die Wirkung von Tolbutamid lag, sowohl was die maximale Blutzuckersenkung, als auch die Wirkungsdauer anbetrifft, zwischen denen der beiden anderen Präparate. Im 6 Std.-Sammelurin konnte bei allen drei Präparaten eine deutliche Zunahme sowohl der Gesamtmenge, als auch der Konzentration der Catecholaminmetabolite festgestellt werden. Bei Chlorpropamid lagen die Werte für Konzentration und Gesamtmenge mit 45,5% bzw. 128,0% an der Spitze, gefolgt von Tolbutamid und Carbutamid. Bei dem mit Chlorpropamid behandelten Rattenkollektiv zeigte sich als Nebenbefund ein statistisch gesicherter diuretischer Effekt.

Bei der Bestimmung des Catecholamingehaltes im Nebennierenmark zeigte nach einer Stunde Carbutamid mit einer rund 27%igen Erniedrigung die stärkste, Chlorpropamid mit einer 9%igen und Tolbutamid mit einer 3%igen Erniedrigung deutlich schwächere Wirkungen. Unter Carbutamidbehandlung waren 2 Wirkungsgipfel zu erkennen. Das Maximum der Hormonverarmung im NNM wurde bei allen Präparaten übereinstimmend in der 6. Stunde gefunden. Die Beobachtung eines gering verzögerten Wirkungsbeginnes am Nebennierenmark mit Nachhinken der Catecholaminwerte nach der ersten Stunde bei bereits erniedrigten Blutzuckerwerten wurde als Effekt einer hypoglykämisch induzierten NNM-Stimulation gedeutet. Daneben haben sich Hinweise für eine direkte, arzneimittelabhängige Wirkung der Sulfonylharnstoffe am Nebennierenmark ergeben.

Bei der Bestimmung der Corticosteroid- und Ascorbinsäuremengen in der Nebennierenrinde nach SuH-Behandlung ergaben sich im Verlauf der ersten Stunde bereits erniedrigte Werte, sodass keine zeitliche Differenzierung gegenüber der Blutzuckerkurve gefunden wurde. Die Tatsache, dass keine direkte Abhängigkeit der Corticosteroidausschüttung von der Höhe des zeitlich zugehörigen Blutzuckerspiegels festgestellt werden konnte, wurde als Hinweis auf eine neben der durch die Hypoglykämie bedingten

Nebennierenrinden-Stimulation bestehende Arzneimittelwirkung der Sulfonylharnstoffe gedeutet.

In der vorliegenden Arbeit konnten Hinweise für eine direkte, arzneimittelabhängige Wirkung der 3 verwendeten Sulfonylharnstoffe Tolbutamid, Chlorpropamid und Carbutamid auf das Nebennierenmark bzw. die Nebennierenrinde erbracht werden. Dabei scheinen die SuH auf das NNM neben einem primären Effekt vorwiegend sekundär über die Blutzuckersenkung zu wirken. Die Beeinflussung der NNR geschieht möglicherweise ebenfalls direkt oder über eine Aktivierung des Hypophysen-Hypothalamus-Systems.

F: Tabellen und Abbildungen:

Tab.1 Blutzucker an Ratten

Tab.2 Catecholaminmetabolite im Rattenurin

Tab.3 Catecholaminbestimmung in Rattennebennieren

Tab.4 Corticosteronbestimmung in Rattennebennieren

Tab.5 Ascorbinsäurebestimmung in Rattennebennieren

Abb.1 Blutzuckerbestimmung

Abb.2a
2b Catecholaminmetabolite im Rattenurin

Abb.3a Catecholaminbestimmung in Rattennebennieren

Abb.3b Darstellung der 1 und 2 Stundenwerte des NNM.-Catecholamingehaltes nach Carbutamid-Behandlung bei narkotisierten und nicht narkotisierten Ratten

Abb.4 Corticosteronbestimmung in Rattennebennieren

Abb.5 Ascorbinsäurebestimmung in Rattennebennieren

Abb.6 Tolbutamid

Abb.7 Chlorpropamid

Abb.8 Carbutamid

(Änderung des Gehalts der Rattennebennieren an Ascorbinsäure, Catecholaminen, Corticosteron sowie des Blutzuckers in % der Kontrolle)

BLUTZUCKER an RATTEN (mg %)

		1 Std.	2 Std.	8 Std.	15 Std.	24 Std.
Kontrolle	n	20	20	20	20	20
	$\bar{x}$	101,8	109,2	105,7	99,4	108,8
	s	9,0	11,3	9,1	9,3	9,4
Tolbutamid	n	20	20	20	20	20
	$\bar{x}$	70,9	75,3	73,5	81,9	97,5
	s	9,0	9,2	9,1	9,5	11,3
	t	10,82	12,2	11,82	5,88	3,44
	P	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,01
Chlorpropamid	n	20	20	20	20	20
	$\bar{x}$	63,7	75,3	67,1	71,5	94,6
	s	14,0	11,9	7,2	14,3	12,0
	t	10,21	9,25	15,80	7,20	4,15
	P	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	> 0,001
Carbutamid	n	20	20	20	20	20
	$\bar{x}$	77,6	88,9	80,1	92,4	110,2
	s	11,8	8,4	5,7	7,5	11,4
	t	7,26	6,46	11,55	2,77	0,42
	P	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,01	> 0,05

t = t zu Kontrolle

P = P zu Kontrolle

Tab.2

CARBOHYDRAMIDMETABOLITE im RATTENURIN

		Urinmenge in ml	Konzentration gamma ml	Gesamtmenge gamma
Kontrolle	n	83	77	77
	$\bar{x}$	6,3 (100%)	12,16 (100%)	75,69 (100%)
	s	3,84	7,08	56,9
Tolbutamid	n	80	66	66
	$\bar{x}$	8,6 (136,7%)	16,09 (131,0%)	121,09 (159,8%)
	s	4,55	6,76	57,1
	t	3,50	3,40	5,19
	P	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Chlorpropamid	n	78	75	75
	$\bar{x}$	13,2 (209,9%)	17,87 (145,5%)	172,95 (228,3%)
	s	3,38	9,61	111,0
	t	12,08	4,21	6,91
	P	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Carbutamid	n	73	65	65
	$\bar{x}$	7,4 (117,7%)	15,16 (123,4%)	96,59 (127,5%)
	s	4,93	7,58	75,3
	t	1,57	2,45	1,90
	P	> 0,05	< 0,05	> 0,05

t = t zu Kontrolle

P = P zu Kontrolle

CATECHOLAMINBESTIMMUNG in RATTENNEBENNIEREN (gamma/mg NN)

		1 Std.	2 Std.	6 Std.	15 Std.	24 Std.
Kontrolle	n	35	36	40	36	40
	$\bar{x}$	0,845	0,773	0,765	0,776	0,766
	s	0,162	0,157	0,137	0,143	0,110
Tolbutamid	n	35	36	40	36	40
	$\bar{x}$	0,823	0,688	0,547	0,642	0,717
	s	0,177	0,140	0,142	0,143	0,103
	t	0,56	2,78	7,0	3,99	2,04
	P	> 0,05	< 0,01	< 0,001	< 0,001	< 0,05
Chlorpropamid	n	36	36	39	37	39
	$\bar{x}$	0,768	0,714	0,582	0,615	0,768
	s	0,358	0,178	0,133	0,117	0,15
	t	0,12	1,51	6,04	5,30	0,06
	P	> 0,05	> 0,05	< 0,001	< 0,001	> 0,05
Carbutamid	n	35	36	39	38	38
	$\bar{x}$	0,614	0,753	0,619	0,702	0,78
	s	0,070	0,188	0,160	0,134	0,11
	t	7,81	0,49	4,38	2,32	0,92
	P	< 0,001	> 0,05	< 0,001	< 0,05	> 0,05

t = t zu Kontrolle
P = P zu Kontrolle

Tab.4

KORTIKOSTERON-STIMULUS in RATTENNEBENNIEREN (gamma/mg NN)

		1 Std.	2 Std.	6 Std.	15 Std.	24 Std.
Kontrolle	n	28	32	30	32	32
	$\bar{x}$	0,0387	0,0381	0,0379	0,0282	0,0379
	s	0,019	0,0108	0,0112	0,0116	0,0107
Tolbutamid	n	32	32	32	30	31
	$\bar{x}$	0,0243	0,0199	0,0184	0,0163	0,0238
	s	0,0115	0,00850	0,00978	0,0123	0,0131
	t	4,55	7,44	7,27	3,94	4,70
	P	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Chlorpropamid	n	29	30	29	30	30
	$\bar{x}$	0,0250	0,0178	0,0157	0,0132	0,0150
	s	0,0116	0,00858	0,00888	0,0081	0,00824
	t	4,20	8,18	8,42	5,90	9,46
	P	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Carbutamid	n	32	28	30	28	30
	$\bar{x}$	0,0197	0,0158	0,0149	0,0131	0,0137
	s	0,0118	0,00885	0,00574	0,0108	0,0104
	t	5,97	8,70	10,0	5,23	9,07
	P	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

t = t zu Kontrolle

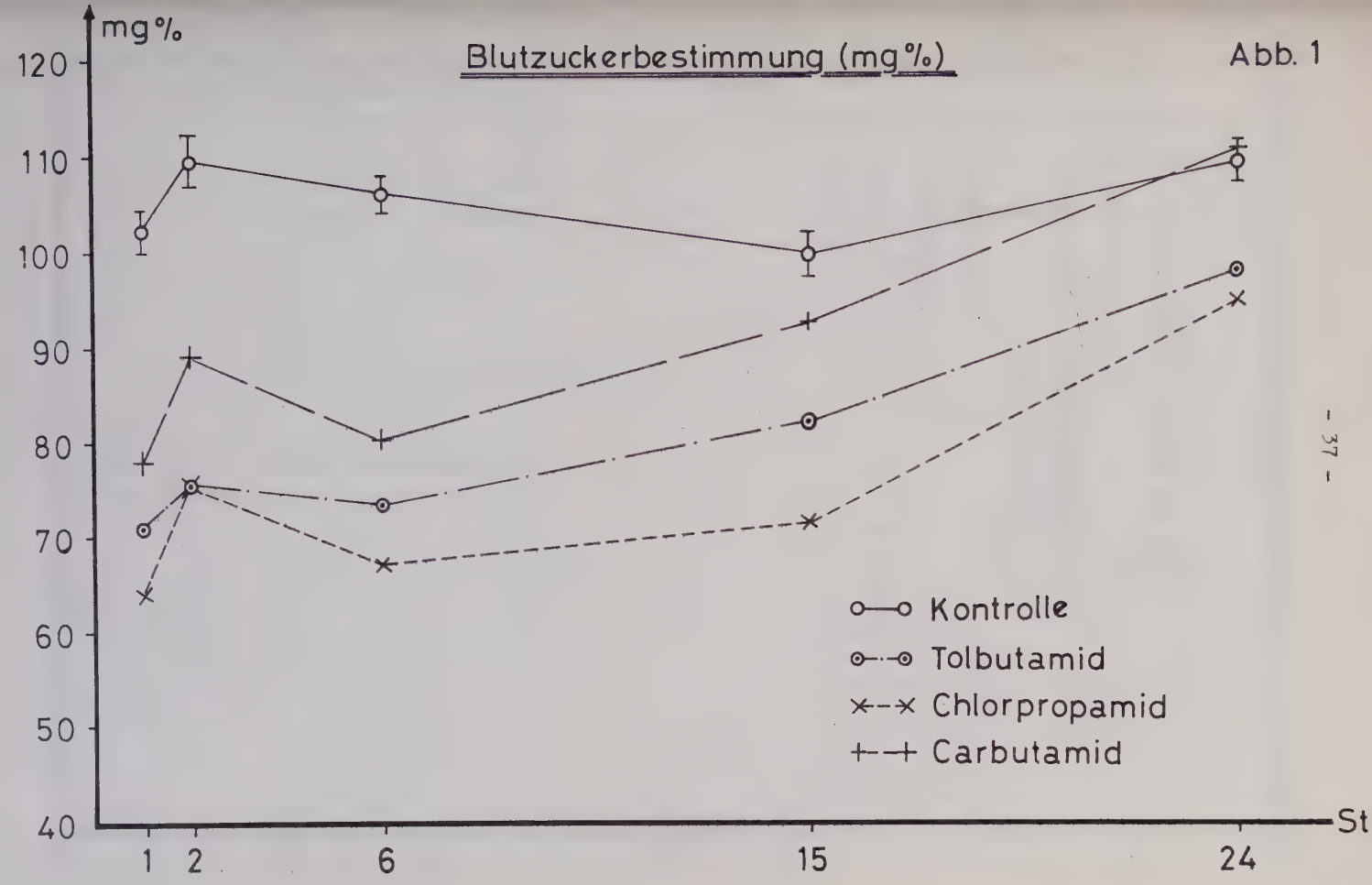
P = P zu kontrolle

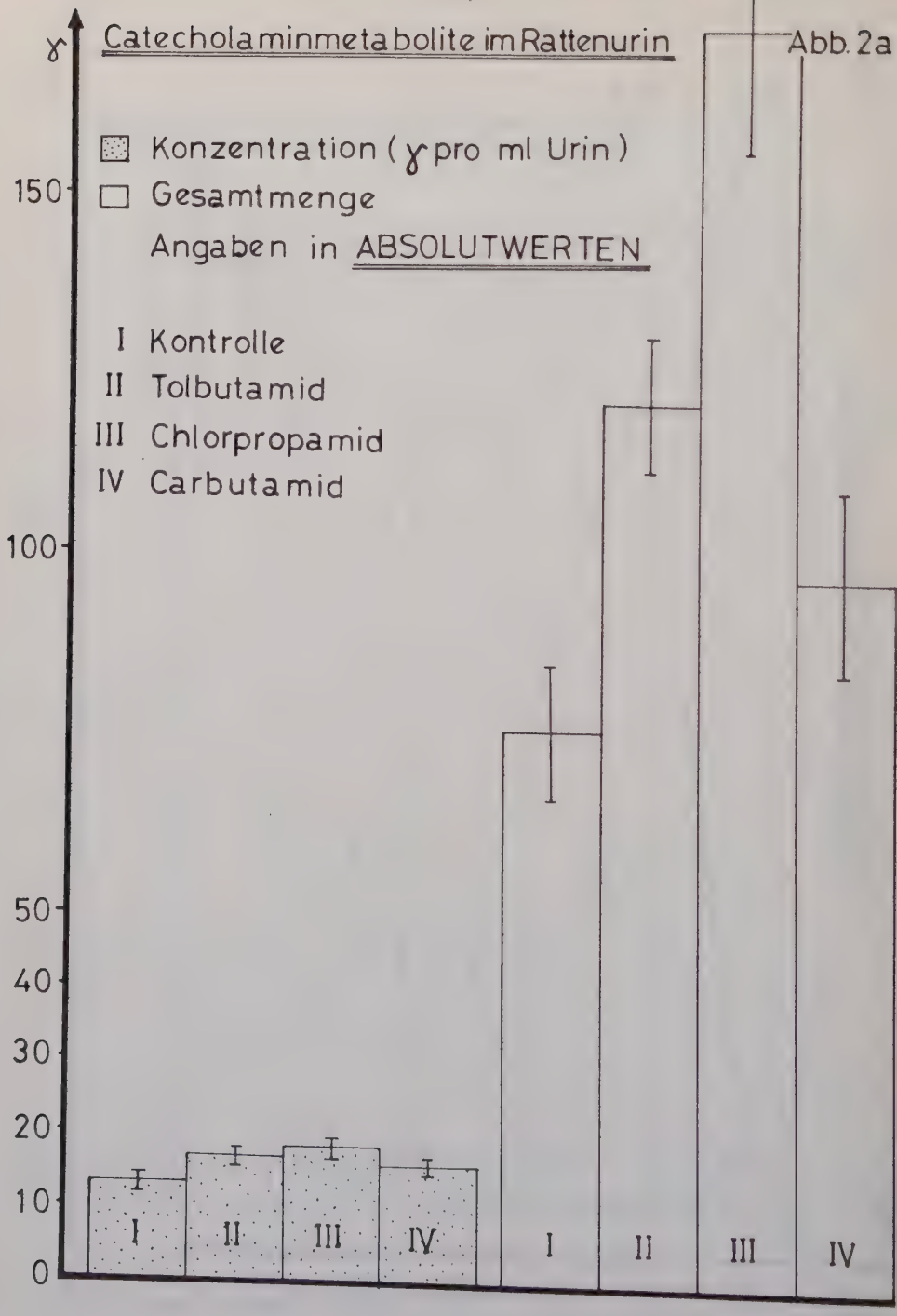
Tab.5

ASCORBINSÄURE in RATTENNEBENNIEREN (mg/100 g NN)

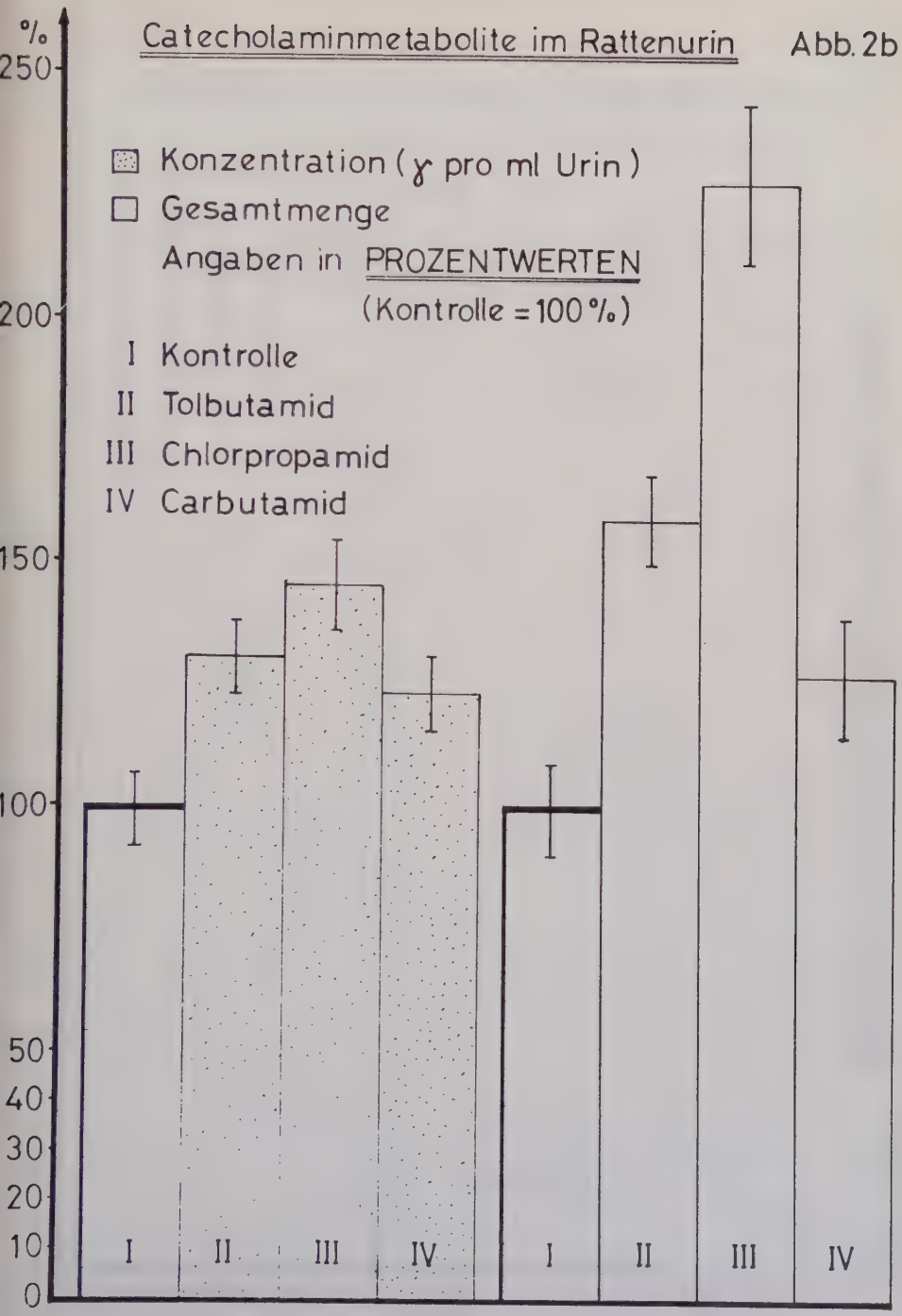
		1 Std.	2 Std.	6 Std.	15 Std.	24 Std.
Kontrolle	n	18	19	16	16	16
	$\bar{x}$	384,5	349,2	379,3	450,6	419,0
	s	54,3	69,3	63,2	46,9	55,4
Tolbutamid	n	19	19	16	16	16
	$\bar{x}$	273,1	242,9	302,8	421,3	369,4
	s	49,9	40,8	75,1	83,1	62,8
	t	3,79	5,8	3,13	1,23	2,37
	P	$<0,001$	$<0,001$	$<0,01$	$>0,05$	$<0,05$
Chlorpropamid	n	19	19	16	15	16
	$\bar{x}$	254,1	221,0	250,1	363,8	340,7
	s	43,4	59,8	64,9	33,6	56,4
	t	8,12	6,13	5,74	5,91	3,98
	P	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$
Carbutamid	n	18	19	16	16	16
	$\bar{x}$	250,3	249,3	235,9	358,4	326,9
	s	53,2	47,4	56,0	54,1	49,6
	t	7,52	5,19	6,83	5,19	5,00
	P	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$

t = t zu Kontrolle
P = P zu Kontrolle


Blutzuckerbestimmung (mg%)
Abb. 1
mg%
120
110
100
90
80
70
60
50
40
1
2
6
15
24
St
Kontrolle
Tolbutamid
Chlorpropamid
Carbutamid


γ
Catecholaminmetabolite im Rattenurin
Abb. 2a
Konzentration (γ pro ml Urin)
Gesamtmenge
Angaben in ABSOLUTWERTEN
I Kontrolle
II Tolbutamid
III Chlorpropamid
IV Carbutamid
150
100
50
40
30
20
10
0
I
II
III
IV
I
II
III
IV

Catecholaminmetabolite im Rattenurin Abb. 2b



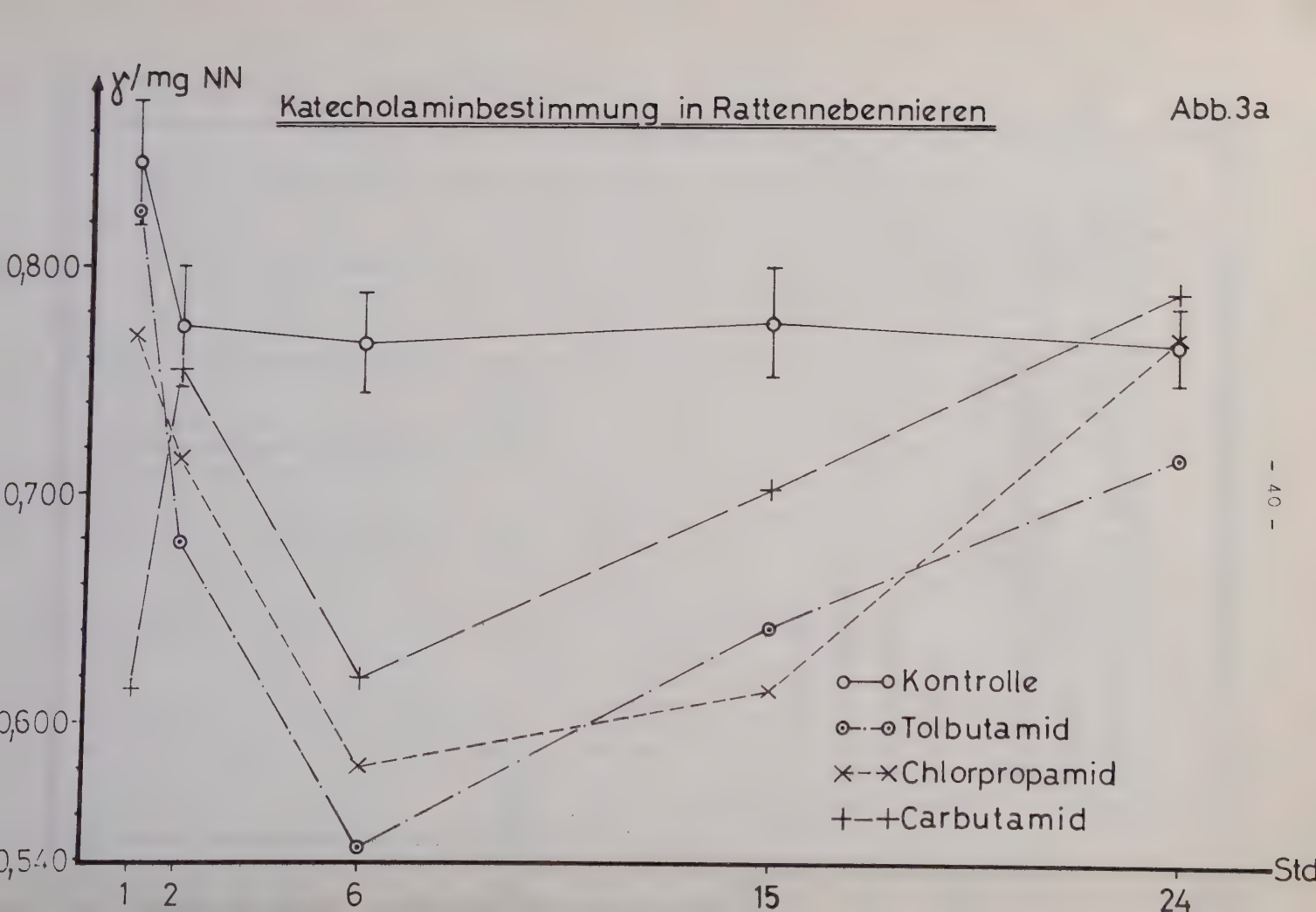
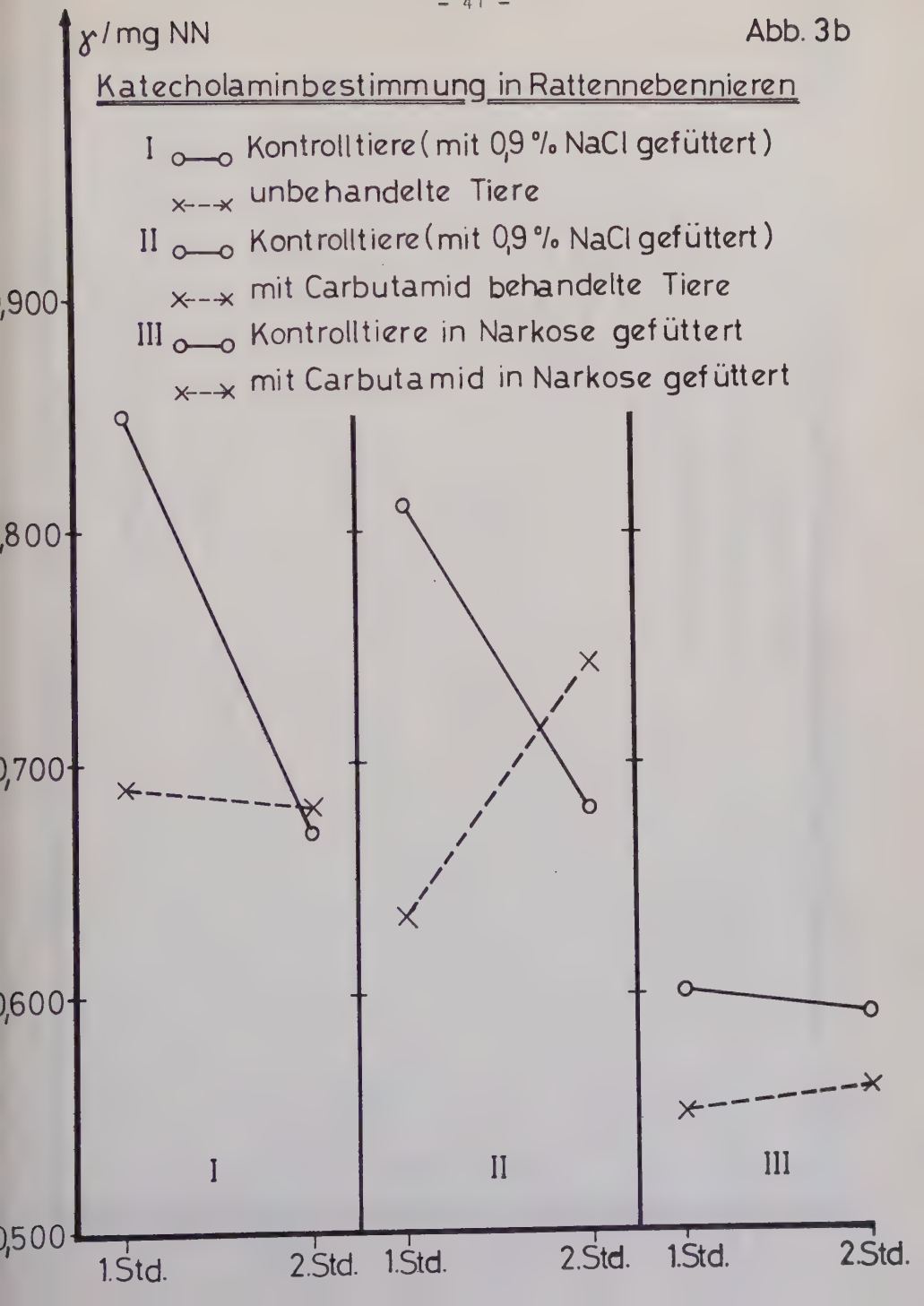
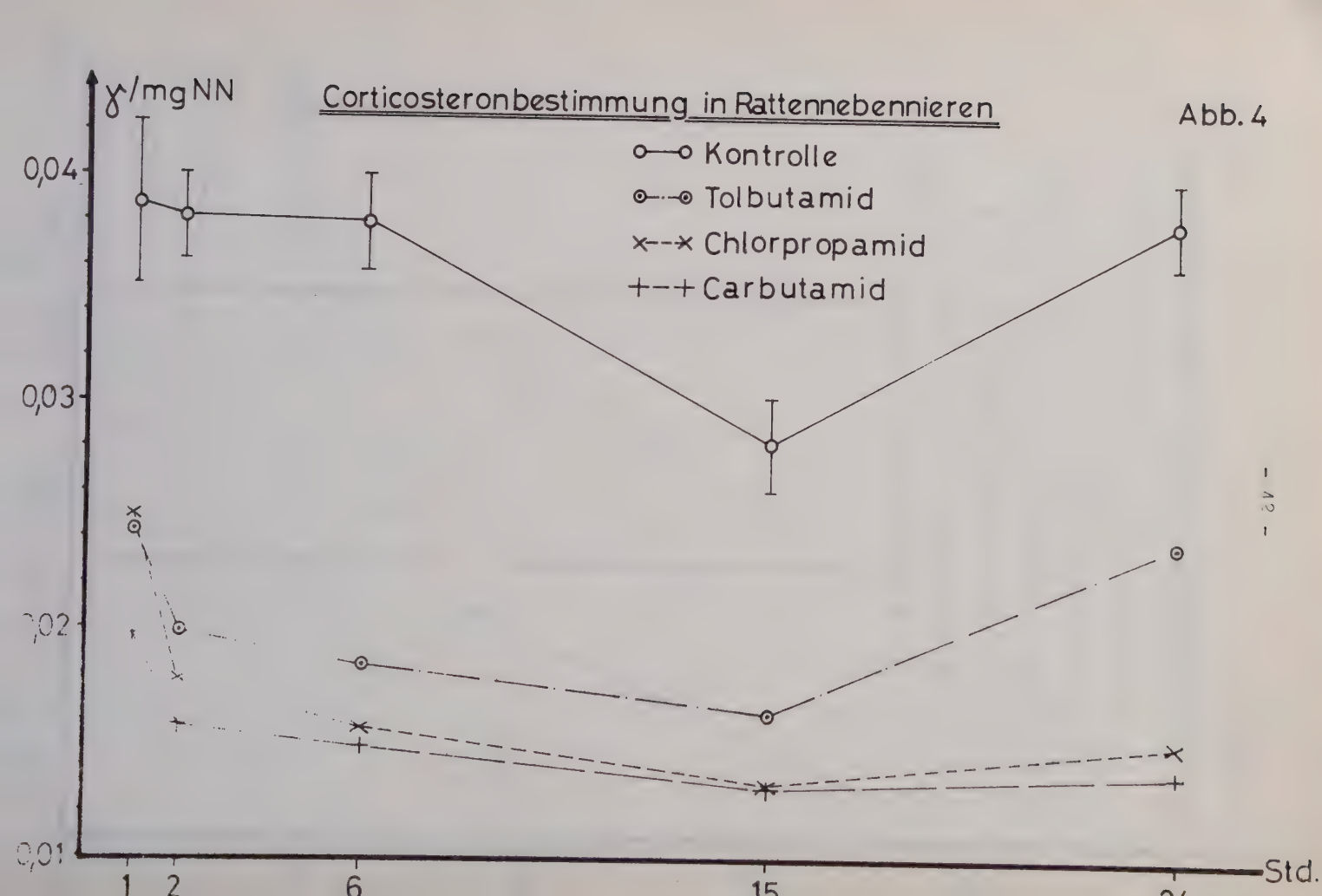

γ/mg NN
Katecholaminbestimmung in Rattennebennieren
Abb. 3a
0,800
0,700
0,600
0,540
Kontrolle
Tolbutamid
Chlorpropamid
Carbutamid
1
2
6
15
24
Std

Abb. 3b


γ / mg NN
Katecholaminbestimmung in Rattennebennieren
I Kontrolltiere (mit 0,9 % NaCl gefüttert)
unbehandelte Tiere
II Kontrolltiere (mit 0,9 % NaCl gefüttert)
mit Carbutamid behandelte Tiere
III Kontrolltiere in Narkose gefüttert
mit Carbutamid in Narkose gefüttert
,900
,800
0,700
0,600
0,500
I
II
III
1.Std.
2.Std.
1.Std.
2.Std.
1.Std.
2.Std.


γ/mg NN
Corticosteronbestimmung in Rattennebennieren
Abb. 4
Kontrolle
Tolbutamid
Chlorpropamid
Carbutamid
0,04
0,03
0,02
0,01
1
2
6
15
Std.

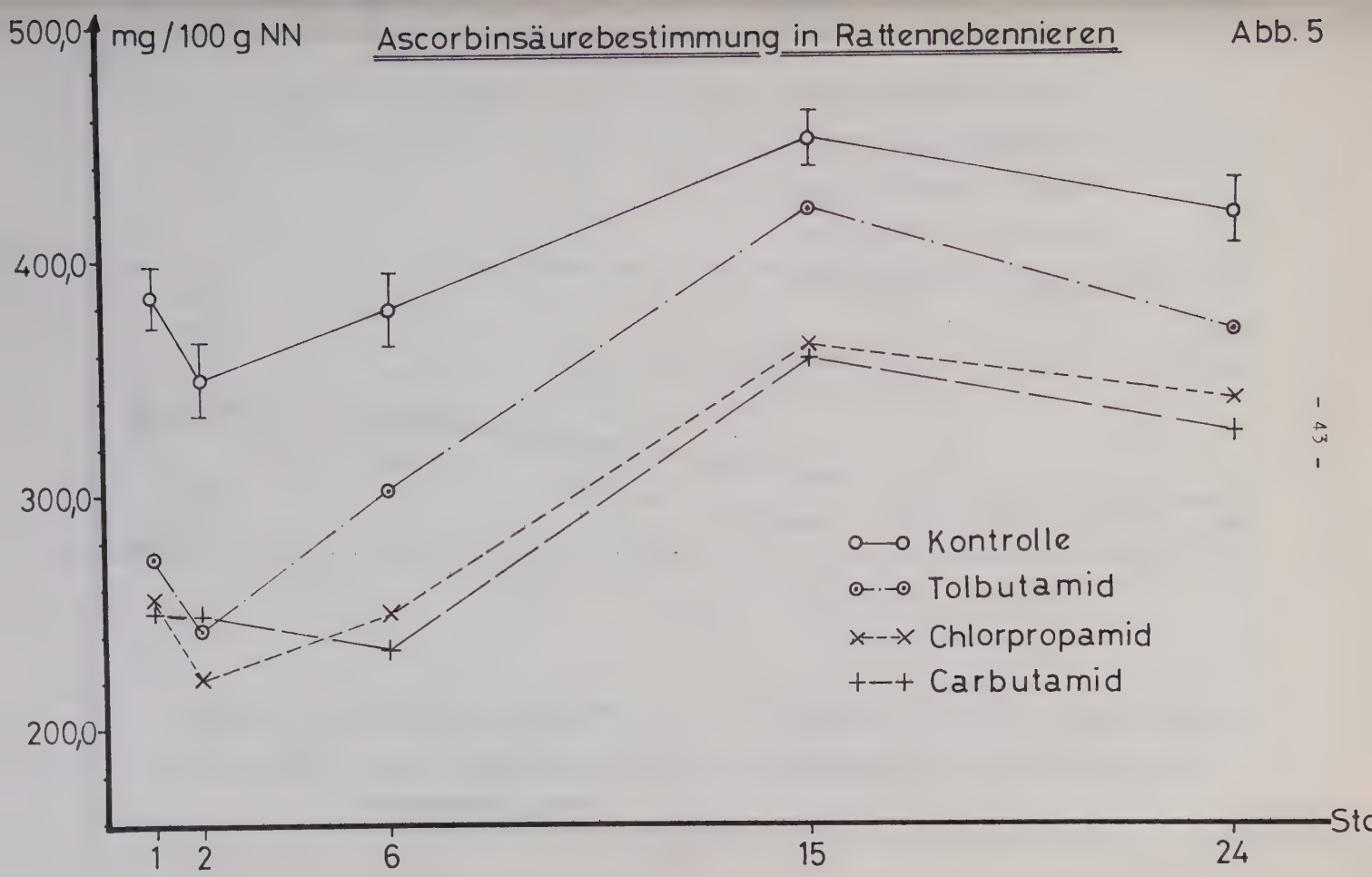

Ascorbinsäurebestimmung in Rattennebennieren
Abb. 5
mg / 100 g NN
500,0
400,0
300,0
200,0
1
2
6
15
24
Kontrolle
Tolbutamid
Chlorpropamid
Carbutamid

Abb. 6

TOLBUTAMID

Änderungen des Gehalts der Rattennebennieren an Ascorbinsäure, Catecholaminen, Corticosteron sowie des Blutzuckers in % der Kontrolle.

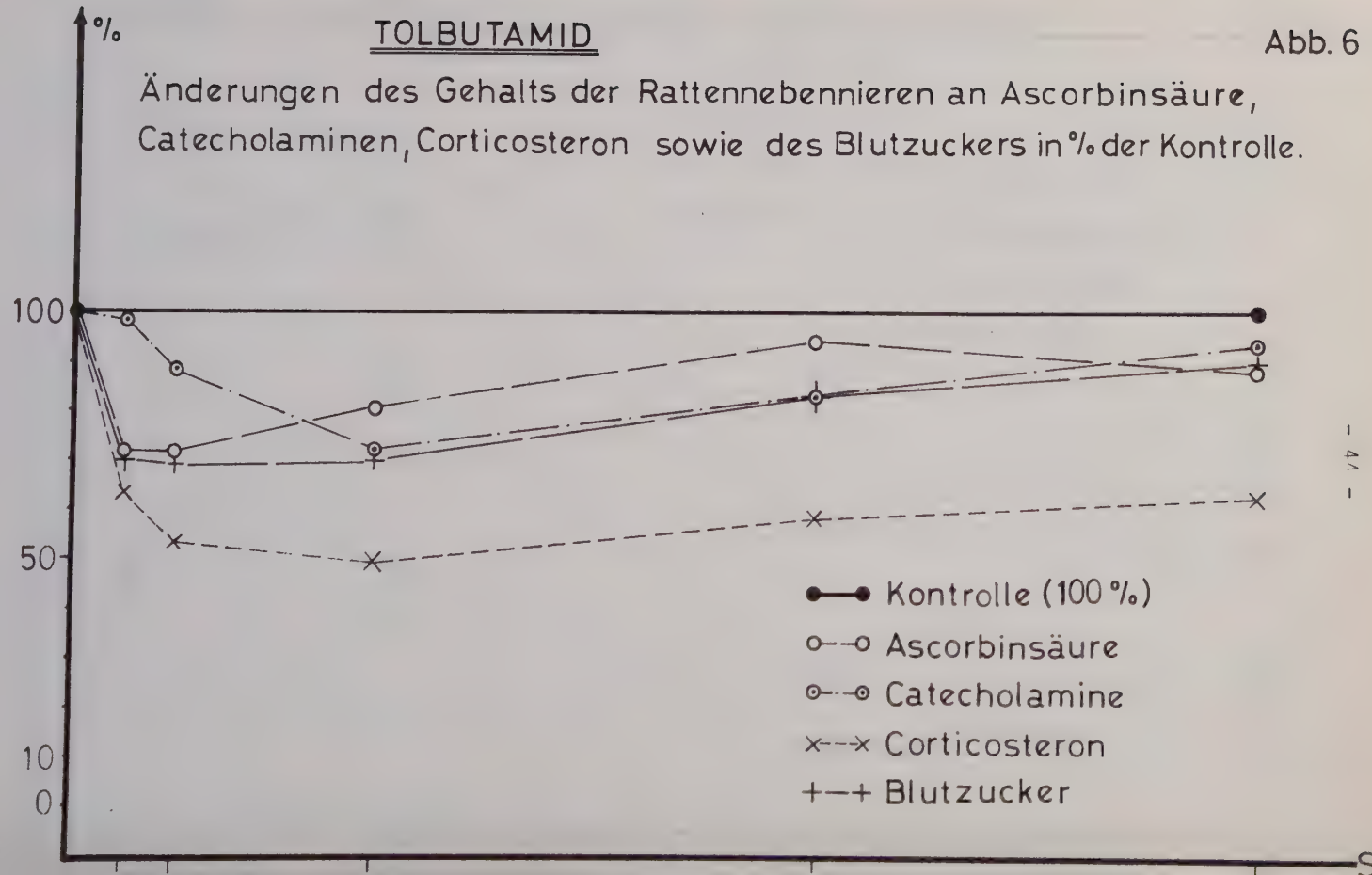
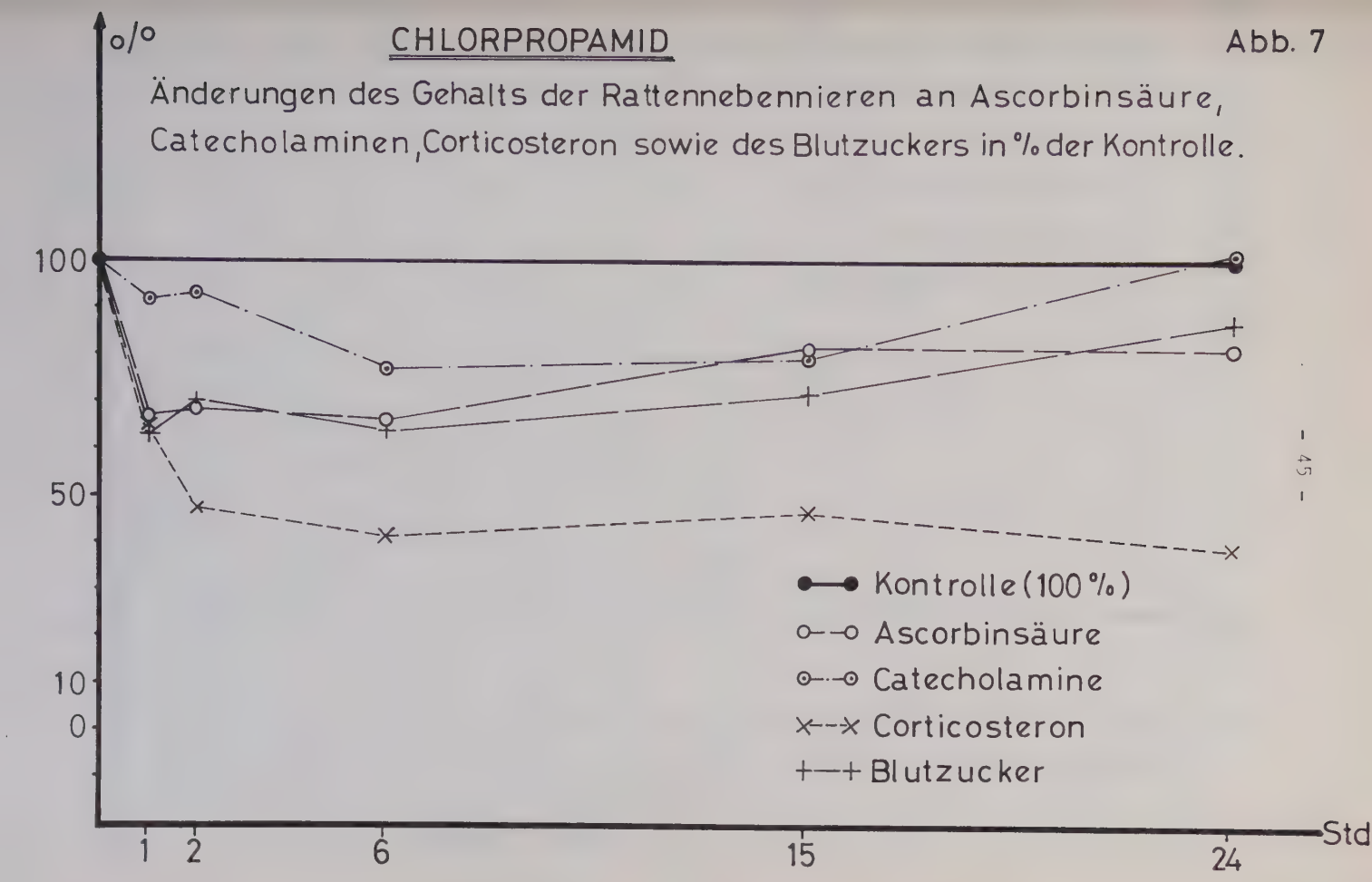
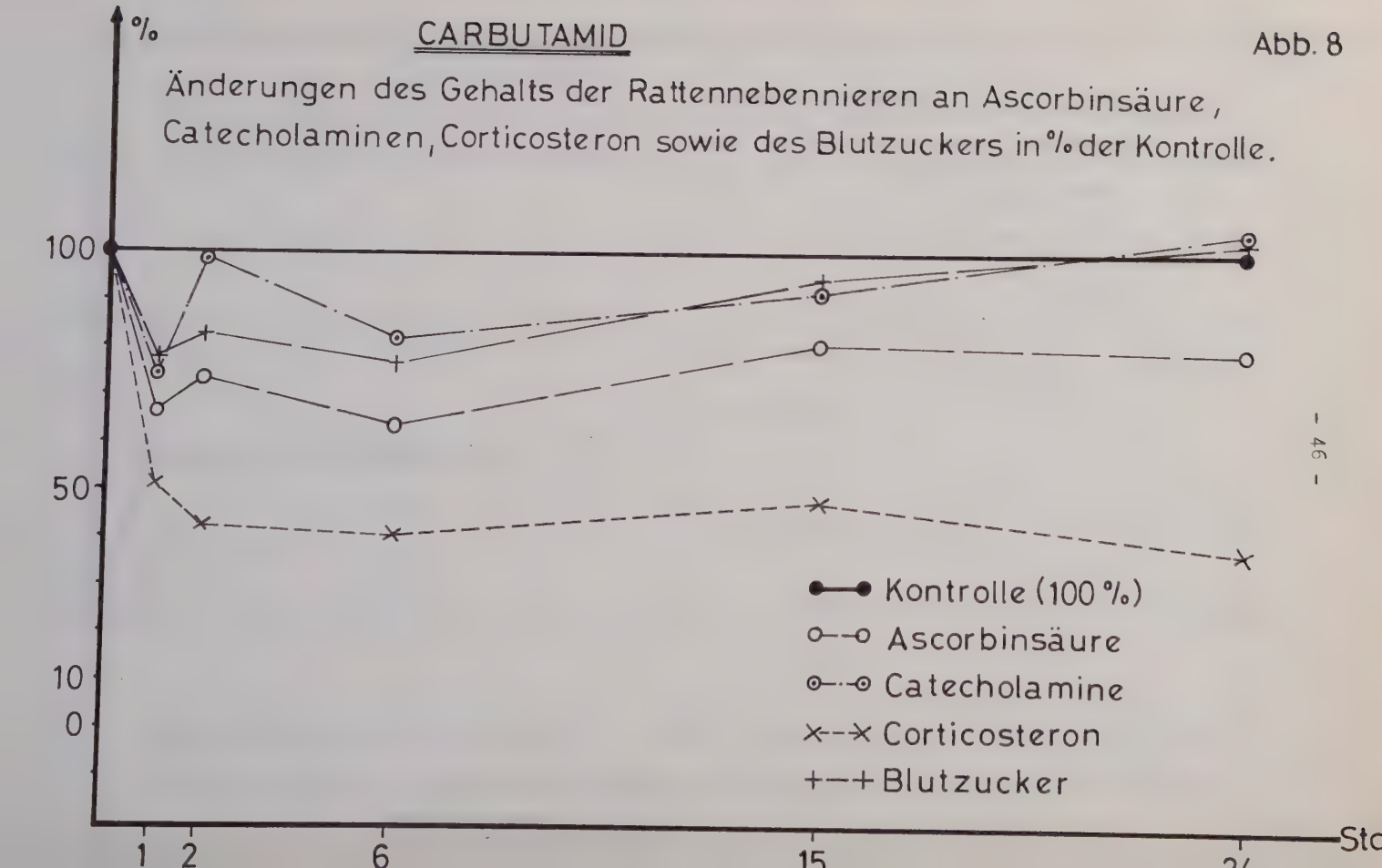


Abb. 7

CHLORPROPAMID

Änderungen des Gehalts der Rattennebennieren an Ascorbinsäure, Catecholaminen, Corticosteron sowie des Blutzuckers in % der Kontrolle.




%
CARBUTAMID
Abb. 8
Änderungen des Gehalts der Rattennebennieren an Ascorbinsäure, Catecholaminen, Corticosteron sowie des Blutzuckers in % der Kontrolle.
100
50
10
0
Kontrolle (100 %)
Ascorbinsäure
Catecholamine
Corticosteron
Blutzucker
1
2
6
15
Std

Literaturzusammenstellung:

BÄNDER, A. und J.SCHOLZ: Spezielle pharmakologische Untersuchungen mit D 860. Dtsch. med. Wschr. 1956, 889-891.

BÄNDER, A. A.HAUSSLER und J.SCHOLZ: Ergänzende pharmakologische Untersuchungen über Rastinon. Dtsch. med. Wschr. 1957, 1557-1564.

BÄNDER, A.: Die Wirkung von N-(4-Methyl-benzolsulfonyl)-N-butylharnstoff auf das Nebennierenmark. Arzneimittel-Forsch. 8, 459-462 (1958).

BÄNDER, A.: Zum Wirkungsmechanismus blutzuckersenkender Sulfonylharnstoffe D 860 und BZ 55. Dtsch. med. Wschr. 1959, 996-1002.

BLOODWORTH, J.M.B. und G.J.HAMWI: Histopathologische Befunde nach Sulfonylharnstoffbehandlung. Diabetes 10, 2-90 (1961).

COX, R.W., E.D.HENLEY und R.H.WILLIAMS: Sulfonylureas and diabetes mellitus. Preliminary studies of the mechanism of action. Diabetes 5, 366 (1956).

CREUTZFELDT, W. und H.FINTER: Blutzucker und histologische Veränderungen nach D 860 bei normalen Kaninchen. Dtsch. med. Wschr. 1956, 892-896.

CREUTZFELDT, W., L.DETERING und O.WELTE: Das B-Zellsystem von normalen und hypophysektomierten Ratten sowie von Kaninchen unter D 860 und diabetogenen Hormonen. Dtsch. med. Wschr. 1957, 1564-1568.

DULIN, W.E., E.H.MORLEY und J.E.NEZAMIS: Role of adrenal in response to orinase. Proc. Soc. exp. Biol. 93, 132-136 (1956).

DULIN, W.E. und W.L.MILLER: Role of the pituitary in the response of rats to tolbutamid. Diabetes 8, 199-204 (1959).

DUNCAN, L.J.P. und D.M.DUNLOP: A clinical trial of BZ 55. Brit. med. J. 1956, Bd.2, 433-439.

EULER, U.S., D.IKKOS und R.LUFT: Adrenaline excretion during resting conditions and after insulin in adrenalectomized human subjects. Acta Endocrinologica 38, 441 (1961).

GEPTS, W., J.CHRISTOPHE und R.BELIENS: Etude expèrimentale du BZ 55 sur le rat normal ou alloxanisè. Modifications morphologiques et en particulier pancrèatiques. Ann. Endocr. (Paris) 17, 278-290 (1956).

GOETZ, F.C. und R.G.EGDAHL: Direct demonstration of insulin release from the pancreas by tolbutamide. Fed. Proc. 17, 55 (1958).

GOLDFIEN, A., M.S.ZILELI, R.H.DUSPOINTES und J.E.BETHUNE: The effect of hypoglycemia on the adrenal secretion of epinephrine and norepinephrine in the dog. Endocrinology 62, 749 (1958).

GUSEK, W.,und J.KRACHT: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Inselwachstum und acinoinsuläre Transformation. Frankfurt. Z. Path. 70, 98-106 (1959).

HAJDU, P. und A.HAUSSLER: Modifikationen zur Blutzuckerbestimmung mit dem Autoanalyzer. Sonderdruck aus "Das Ärztliche Laboratorium" 8.Jahrgang Heft Nr.9/10, S.274-280 (1962).

v.HOLT, C.: Experimentelle Untersuchungen über die Wirkungsweise eines antidiabetischen Harnstoffderivates. Verh.Dtsch.Ges. Inn.Med. 62, 520 (1956).

v.HOLT, C., L.v.HOLT, J.KRACHT und P.KRÖNER: Wirkung von N_1-sulfanilyl-N_2-n-butylcarbamid auf Kohlenhydratstoffwechsel und endokrines System. Schweiz. med. Wschr. 86, 1123 (1956).

HOUSSAY, B.A. und J.C.PENROS: Action of the hypoglycemic sulfonyl compounds in hypophysectomized, adrenalectomized and depancreatized animals. Metabolism 5, 727-732 (1956).

KRACHT, J. und J.G.RAUSCH-STROOMANN: Das Inselzellsystem unter N_1-sulfanilyl-N_2-n-butylcarbamid. Naturwissenschaften 43, 180 (1956).

KRACHT, J., C.v.HOLT und L.v.HOLT: Morphologische Befunde zur Wirkungsweise oraler Antidiabetica. Endocrinology 34, 129-146 (1957).

LANG, St. und S.SHERRY: Some effects of orinase in the rat. Metabolism 5, 733-738 (1956).

MOHNIKE, G., K.W.KNITSCH, H.BOSER, G.WERNER und S.WERNER: Untersuchungen über die Wirkung von D 860 an Geweben und Fermenten in vitro.
Dtsch. med. Wschr. 1957, 1580-1581.

MORTIMORE, G.E., V.C. DI RAIMONDO und P.H.FORSHAM: Metabolic effects of orinase in diabetes including two cases complicated by other endocrinopathies.
Metabolism 5, 840-846 (1956).

PFEIFFER, E.F., K.SCHÖFFLING und H.STEIGERWALD: Die Ausscheidung von Nebennierenrindenhormonen während der Behandlung mit D 860.
Dtsch. med. Wschr. 81, 838-841 (1956).

PFEIFFER, E.F., H.STEIGERWALD, W.SANDRIFTER, A.BÄNDER, A.MAGER, V.BECKER und K.RETIENE: Vergleichende Untersuchungen von Morphologie und Hormongehalt des Kälberpankreas nach Sulfonylharnstoffen.
Dtsch. med. Wschr. 1957, 1568-1574.

PFEIFFER, E.F., M.PFEIFFER, H.DITSCHUNEIT und Chang-SU AHN: Ueber die Bestimmung von Insulin im Blut am epididymalen Fettanhang der Ratte mit Hilfe markierter Glucose.
(2. experimentelle und klinische Erfahrungen).
Klin. Wschr. 1959, 1239-1245.

PFEIFFER, E.F., H.DITSCHUNEIT und R.ZIEGLER: Über die Bestimmung von Insulin im Blut am epididymalen Fettanhang der Ratte mit Hilfe markierter Glucose. Die Dynamik der Insulinsekretion des Stoffwechselgesunden und des Altersdiabetikers nach wiederholter Belastung mit Glucose, Sulfonylharnstoffen und menschlichem Wachstumshormon. Ein Beitrag zur Pathenogenese des menschlichen Altersdiabetes.
Klin. Wschr. 415-466 (1961).

RAUSCH-STROOMANN, J.G. und H.SAUER: Steroidhormonuntersuchungen unter Therapie mit Nadisan.
Klin. Wschr. 34, 707 (1956).

RAUSCH-STROOMANN, J.G. und H.SAUER: 17-Hydroxycorticosteron-Spiegel im Plasma unter Therapie mit N_1-sulfanyl-N_2-N-butyl-carbamid.
Klin. Wschr. 550-551 (1957).

RENOLD, A.E., A.I.WINEGRAD, E.R.FROESCH und G.W.THORN: Studies on the action of certain sulfonylurea derivatives.
Metabolism 5, 757-767 (1956).

ROOT, M.A.: Pharmacology of carbutamide (p-aminophenylsulfonyl-butylcarbamide).
J.Pharmacol. 119, 468-478 (1957).

ROOT, M.A.: Effect of carbutamide on the insulin content of the dog pancreas.
Diabetes 6, 12-16 (1957).

ROOT, M.A., M.V.SIGAL und R.C.ANDERSON: Pharmakology of 1-(p-chlorobenzenesulfonyl)-3-n-propylurea (Chlorpropamide).
Diabetes 8, 7-13(1959).

SARCOINE, E.J., M.BACK, J.E.SOKAL, D.ALMAN und L.KROLOCK: Elevation of plasma epinephrine levels produced by glucagon in vivo.
Endocrinology 72, 523 (1963).

SCHNEIDER, J.A., E.D.SALGADO, D.JAEGER and Ch.DELAHUNT: The pharmacology of chlorpropamide.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 74, 427-442 (1959).

SHORE, P.A. und J.S.OLIN: Identifikation and chemical assay of norepinephrine in brain and other tissues.
Ann.N.Y. Acad. Sci., 122, 296 (1958).

SKEGGS,jr. L.T.
Am.J.Clin.Path. 28, 311 (1957).

SZÜCS, S. und G.CSAPO: Hypophyseo-adrenal function in diabetic angiopathy.
Acta Endocr. 46, 135 (1964).

UNGER, R.H., A.M.EISENTRAUT, M.S. Mc CALL und L.L.MADISON:
J.Clin. Invest. 41, 688 (1962).

VALLANCE-OWEN, I.: "Insilin antagonists".
Brit. Med. Bull. 16, 214-218 (1960).

WOLWOD, A.J. und R.KNIGHT: The determination of 3-methoxy 4-hydroxy mandelic acid in urine.
J.Clin.Path. 14, 502 (1961).

ZUKOSKI, C.F.: Mechanism of action of insulin hypoglycemia on adrenal cortical secretion.
Clin. Res. 13, No.1, 47 (1965).

Herrn Priv. Doz. Dr. med. G. Vogel bin ich sowohl für die Ueberlassung des Themas dieser Arbeit als auch für seine stete Bereitschaft zu kritischen Hinweisen und Anregungen zu grossem Dank verpflichtet.
Der Farbwerke Hoechst AG. danke ich für die grosszügige materielle Unterstützung ebenso wie meiner Mutter, Frau B.Noetzel, für die Niederschrift der Dissertation.

Lebenslauf

Als Sohn des Arztes Dr.med. Max Noetzel und seiner Ehefrau Barbara, geb.Strobel, wurde ich am 3.Juni 1939 in Frankfurt a.M.-Höchst geboren. Nach Besuch der Volksschule Frankfurt a.M.-Unterliederbach, des Leibniz-Gymnasiums in Frankfurt a.M.-Höchst und der Höheren Privatlehranstalt Dr.Richter in Kelkheim /Taunus, wo ich am 18.2.1960 das Abitur bestand, habe ich das gesamte medizinische Studium an der Johann Wolfgang Goethe Universität zu Frankfurt a.M. absolviert. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung bestand ich am 1o.3.1961, die ärztliche Vorprüfung am 21.2.1963 und die ärztliche Prüfung am 29.7.1966. Zur Zeit bin ich als Medizinal-Assistent am St.Katharinen-Krankenhaus in Frankfurt a.M. tätig.

Meine akademischen Lehrer in Frankfurt a.M.
waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Altmann
Artelt
Bethke
Brehm
Degkwitz
Frey
Frick
Geißendörfer
Gerchow
Giersberg
Greven
Grüner
Güntz
Halbsguth
Heinecker
Heinz
Heller
Hellriegel
Herrmann
Herzberg
Hirsch
Hövels
Hoff
Holtz
Jürgens
Käser
Kahlau
Kootz
Kuhlenkampff
Kummer
Landes
Lapp
Leonhardi
Lieb
Martin
Mittermaier
Müser
Ortmann
Otto
Palm
Pierlet
Radenbach
Rajewsky
v.Reckow
Ried
Rossberg
Rotter
Royen
Schmith
Schoberth
Schwenzer
Starck
Strnad
Thiel
Ungeheuer
Wezler
Weiße
Wieland
Zimmermann
Zutt